Untersuchungen zur Phylogenie der Basidiomyceten anhand des Vergleichs der Nukleotidsequenzen ihrer 5S ribosomalen Ribonukleinsäuren

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
MICHAEL GOTTSCHALK
aus Göttingen

1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546524_0009

Untersuchungen zur Phylogenie der Basidiomyceten anhand des Vergleichs der Nukleotidsequenzen ihrer 5S ribosomalen Ribonukleinsäuren

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
MICHAEL GOTTSCHALK
aus Göttingen

1985

Tag der mündlichen Prüfung:	28. 3. 1985
Dekan:	Professor Dr. H. U. Seitz
1. Berichterstatter:	Professor Dr. F. Oberwinkler
2. Berichterstatter:	Professor Evamarie Sander, Ph. D.

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. F. Oberwinkler am Institut für Biologie I, Lehrbereich Spezielle Botanik, Universität Tübingen, angefertigt.

Herrn Prof. Oberwinkler danke ich für die Überlassung des Themas und sein Interesse am Verlauf und an den Ergebnissen meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. P. Blanz für die exzellente Betreuung während meiner Arbeit, für seine ständige Diskussionsbereitschaft und die vielen Anregungen, die ich durch ihn erhalten habe.

Die Einarbeitung in molekularbiologische Arbeitstechniken wurde mir durch viele Ratschläge von Herrn Dr. A. Brennicke wesentlich erleichtert. Dafür und für sein Interesse an meiner Arbeit sei ihm herzlich gedankt.

Wertvolle Hinweise und Anregungen in Bezug auf die RNA-Sequenzierungstechniken erhielt ich von Herrn Dr. G. Krupp und Herrn Prof. H. Gross, Universität Würzburg, wofür ich ihnen herzlich danke.

Frau Prof. Evamarie Sander, Ph. D., danke für ihre Bereitschaft, meine Arbeit zu begutachten.

Die Studienstiftung des deutschen Volkes förderte meine Arbeit durch ein großzügiges Stipendium, wofür ich ihr herzlich danke.

Den Mitarbeitern unseres Labors danke ich für die angenehme Atmosphäre, in der diese Arbeit entstanden ist. Frau C. Specht, die die photographischen Arbeiten mit viel Sorgfalt und Geduld ausführte, sei ebenfalls gedankt.

Meiner Frau Gabi danke ich für ihre liebevolle Zuwendung und für ihr Verständnis für meine Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	5
2.1	Material	5
2.1.1	Liste der bearbeiteten Stämme	5
2.1.2	Chemikalien	7
2.1.3	Enzyme	7
2.1.4	Nährmedien	8
2.1.5	Puffer und Lösungen	9
2.1.6	Geräte und sonstige Materialien	13
2.2	Methoden	13
2.2.1	Anzucht der Pilzstämme	14
2.2.2	Fällung von Nukleinsäuren	14
2.2.3	Polymerisation von Acrylamidgelen	15
2.2.4	Lyse der Zellen und Extraktion der Nukleinsäuren	15
2.2.5	Isolierung der 5S rRNA	15
2.2.6	Konzentrationsbestimmung der RNA im Photometer	16
2.2.7	Synthese von (γ-^{32}P)-ATP	18
2.2.8	Synthese von 5'-(^{32}P)-pCp für die 3'-Markierung von RNA	18
2.2.9	3'-(^{32}P)-Markierung der 5S rRNA	18
2.2.10	Dephosphorylierung der 5S rRNA	19
2.2.11	5'-(^{32}P)-Markierung der dephosphorylierten 5S rRNA	19
2.2.12	Reinigung der (^{32}P)-markierten 5S rRNA durch Gelelektrophorese	20
2.2.13	Sequenzierung der 5S rRNA	22
2.2.14	Trennung der Spaltprodukte in denaturierenden Polyacrylamidgelen	23
2.2.15	Bestimmung des 3'-terminalen Nukleotids	28
2.2.16	Bestimmung des 5'-terminalen Nukleotids	28
2.2.17	Expositionszeiten für Sequenzgele	30
2.2.18	Berechnung der KNUC-Werte und der Standard-Fehler	30
2.2.19	Konstruktion des in Abb. 6 dargestellten Dendrogramms	31

3.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	32
3.1.	Evolution auf molekularer Ebene	32
3.1.1	Ursachen der molekularen Evolution	32
3.1.2	Die Verwendung von ribosomalen RNAs für Untersuchungen mit phylogenetischen Fragestellungen	34
3.1.3	Mögliche Fehlerquellen bei der Ableitung von phylogenetischen Beziehungen anhand von 5S rRNA Sequenzen und das Auflösungsvermögen der 5S rRNA	35
3.2.	Aspekte der verschiedenen Auswertungsverfahren beim Vergleich von 5S rRNA Sequenzen	36
3.2.1	Die Bedeutung der 5S rRNA Sekundärstruktur für die Ableitung von phylogenetischen Beziehungen bei den Basidiomyceten	36
3.2.2	Die "Signature Nucleotide Analysis" als Methode zur Ableitung von natürlichen Verwandtschaften	42
3.2.3	Die Bewertung der 5S rRNA Primärstruktur	50
3.3	Diskussion der 5S rRNA Sequenzen in Bezug auf einzelne Verwandtschaften innerhalb der Basidiomyceten	52
3.3.1	Ustilaginales	52
3.3.2	Sporobolomyces salmonicolor	55
3.3.3	Trichosporon oryzae	55
3.3.4	Rhodosporidium malvinellum	56
3.3.5	Graphiola phoenicis	56
3.3.6	Septobasidium carestianum	58
3.3.7	Auriculariales	58
3.3.8	Uredinales	61
3.3.9	Atractiellales	63
3.3.10	Microstroma juglandis	65
3.3.11	Christiansenia pallida	66
3.3.12	Exidia glandulosa und Efibulobasidium albescens	66
3.3.13	Tulasnellales	67
3.3.14	Lycoperdon pyriforme	68
3.3.15	Taphrina deformans	68
3.3.16	Kabatiella microsticta	69
4.	ZUSAMMENFASSUNG	70
5.	LITERATURVERZEICHNIS	72

Liste der im Text verwendeten Abkürzungen

Ap	Adenosin-3'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Cp	Cytidin-3'-monophosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Gp	Guanosin-3'-monophosphat
KNUC	K = Konstante, NUC = Nukleotid
rDNA	ribosomal Desoxyribonucleic Acid (= ribosomale Desoxyribonukleinsäure)
PAA	Polyacrylamid
pCp	3'-Phospho-Cytidin-5'-monophosphat
rRNA	ribosomal Ribonucleic Acid (= ribosomale Ribonukleinsäure)
SDS	Sodiumdodecylsulphate (= Natriumdodecylsulphat)
Up	Uridin-3'-monophosphat

1. EINLEITUNG

Die Basidiomyceten sind eine Klasse von höheren Pilzen, die durch ein exogen sporenbildendes Meiosporangium, die Basidie, gekennzeichnet ist. Die Bedeutung dieser Pilze läßt sich im wesentlichen mit drei Punkten charakterisieren:

1. Sie spielen eine wichtige Rolle beim Abbau von totem organischem Material, insbesondere Holz.
2. Besonders die Brandpilze, die Rostpilze und die Porlinge sind wirtschaftlich bedeutsame Parasiten von Kulturpflanzen und Nutzhölzern.
3. Als Symbiosepartner und Mykorrhizenbildner unserer Waldbäume sind insbesondere die Homobasidiomyceten maßgeblich am Aufbau des Ökosystems Wald beteiligt.

Da kaum Fossilien von Basidiomyceten bekannt sind, werden derzeit alle Überlegungen zu deren Phylogenie und Systematik vom Merkmalsspektrum der rezenten Vertreter abgeleitet. Dabei wurden bisher vor allem morphologische und ultrastrukturelle Merkmale wie die Basidienmorphologie und die Struktur der Septenporen sowie die Lebensweise der Organismen herangezogen. Die Fähigkeit zur Ausbildung von Hefestadien und/oder Sekundärsporen wird als Unterscheidungsmerkmal für die zwei Hauptgruppen der Basidiomyceten verwendet. Während die Heterobasidiomyceten diese Eigenschaften besitzen, fehlen sie bei den Homobasidiomyceten. Insbesondere bei den Heterobasidiomyceten gibt es jedoch eine Reihe von Vertretern die nur geringe morphologische Differenzierungen aufweisen und deren verwandtschaftliche Beziehungen innerhalb der Basidiomyceten deshalb mit morphologischen Merkmalen allein nicht aufgelöst werden können. Hinzu kommt, daß auch die Beziehungen morphologisch gut charakterisierbarer Verwandtschaften, wie beispielsweise der Uredinales oder der Septobasidiales, untereinander weitgehend unklar sind.

Aus diesem Grund bot es sich an, den Vergleich von biochemischen Merkmalen, insbesondere von Makromolekülsequenzen für eine Verwandtschaft charakteristischer oder kontrovers diskutierter Organismen zu verwenden, um zusätzliche Merkmale zur Auflösung der oben erwähnten Problematik zu erhalten. Die 5S rRNA wurde gewählt, weil sie mit einer

Länge von etwa 120 Nukleotiden relativ kurz und damit unmittelbar sequenzierbar ist. Außerdem wurden bei 5S rRNAs, im Gegensatz zu den anderen ribosomalen RNAs, nur in einzelnen Fällen modifizierte Nukleotide gefunden, welche die Sequenzierung erschweren. Zudem wurden 5S rRNA Sequenzen bereits für eine Reihe von Untersuchungen mit phylogenetischen Fragestellungen herangezogen (KÜNTZEL et al., 1981, 1983; GEORGE et al., 1983; KUMAZAKI et al., 1983; CHEN et al., 1984; ERDMANN et al., 1984), was die Verwendbarkeit dokumentiert und eine Einschätzung der Wertigkeit des Merkmals erlaubt. Die von anderen Autoren publizierten 5S rRNA Sequenzen von 31 verschiedenen Basidiomyceten (WALKER und DOOLITTLE, 1982, 1983; HUYSMANS et al., 1983; WALKER, 1984) können zur Ergänzung der eigenen Daten verwendet werden.

Die in dieser Arbeit untersuchten Taxa der Basidiomyceten, ihre systematische Relevanz und Problematik sollen im folgenden kurz charakterisiert werden.

Die Auriculariales sind durch ihre stichischen Phragmobasidien mit aktiver Sporenabschleuderung charakterisiert. Weil einige parasitische Vertreter mit einfachen morphologischen Merkmalen auf Moosen und Farnen vorkommen, werden sie als Basisgruppe der Basidiomyceten angesehen (OBERWINKLER, 1978a, 1982). Die Ordnung erweist sich jedoch als heterogen in Bezug auf die Septenporen. So besitzen Hirneola und Auricularia Doliporen mit Parenthesom (SEBALD, 1977; TU und KIMBROUGH, 1978; KHAN und KIMBROUGH, 1982), während die parasitischen und einige saprophytische Vertreter einfache Septenporen aufweisen (KHAN und KIMBROUGH, 1982; OBERWINKLER und BANDONI, 1982a). Die hohe Divergenz der 5S rRNA Sequenzen von Auricularia auricula-judae (HUYSMANS et al., 1983) und Rhizoctonia crocorum (WALKER und DOOLITTLE, 1983), der imperfekten Form von Helicobasidium purpureum (BUDDIN und WAKEFIELD, 1927) deuten darauf hin, daß die beiden Gruppen keine engere Verwandtschaft darstellen. Neben Parasiten auf höheren Pflanzen wie Helicobasidium purpureum kommen bei den Auriculariales auch Mycoparasiten wie Platygloea peniophorae vor. Da gerade die parasitischen Vertreter mit einfachen Septenporen nur wenig morphologische Differenzierungen aufweisen, bleibt zu prüfen, inwieweit die 5S rRNA Sequenzen dieser Organismen divergieren. Ähnliche Verhältnisse liegen bei der Ordnung der Atractiellales (OBER-

WINKLER und BANDONI, 1982a) vor, in der die gastroiden, d.h. ihre Sporen nicht aktiv abschleudernden, auricularioiden Vertreter zusammengefaßt sind. Neben Organismen mit Phragmobasidien wurden auch solche mit Holobasidien in diese Ordnung gestellt. Die sehr unterschiedlichen 5S rRNA Sequenzen von Agaricostilbum palmicolum (die Art wurde von BRADY und SUTTON, 1984, in A.pulcherrimum umbenannt) und Chionosphaera apobasidialis (WALKER, 1984) deuten eine heterogene Zusammensetzung der Ordnung an.

Wegen der Übereinstimmungen in ihrer Basidienmorphologie und in den einfachen Septenporen werden die Ordnungen der Uredinales und Septobasidiales von parasitischen Auriculariales abgeleitet (OBERWINKLER, 1977, 1982). Für die Untersuchungen wurden zwei von Gymno- zu Angiospermen wirtswechselnde Rostpilze, Coleosporium tussilaginis und Gymnosporangium clavariaeforme als ursprüngliche Vertreter ausgewählt. Als höher entwickelt gelten die ebenfalls untersuchte, von monokotylen zu dikotylen Angiospermen wirtwechselnde Art Puccinea poarum, sowie Endophyllum sempervivi als autoezischer Rost. Für die auf Schildläusen parasitierenden Septobasidiales wurde Septobasidium carestianum, die in Mitteleuropa häufigste Art, als repräsentativer Vertreter untersucht.

Aufgrund ihrer Basidienmorphologie und unterschiedlichen Septenporen werden die Brandpilze in die Ustilaginales und die Tilletiales unterteilt (DURAN, 1973; OBERWINKLER, 1977). Die geringe Homologie der 5S rRNA Sequenzen von Ustilago violacea (WALKER und DOOLITTLE, 1982) und Tilletia controversa (WALKER und DOOLITTLE, 1983) steht im Einklang mit dieser taxonomischen Konsequenz. Innerhalb der Ustilaginales selbst zeigt sich jedoch eine bemerkenswerte Heterogenität in Bezug auf das Wirtsspektrum, das Befallsbild, das Keimungsverhalten und die Siderochrome (DEML und OBERWINKLER 1980, 1982a, 1982b; SCHMITTER, 1984). Daher wurden neben Ustilago hordei, der Typusart der Gattung, mehrere andere, in den oben genannten Kriterien von U. hordei abweichende Vertreter der Ustilaginales untersucht.

Die Gattung Rhodosporidium wird aufgrund der Basidienmorphologie und ihrer Sideramine (DEML und OBERWINKLER, 1980, 1982a) als den Ustilaginales nahestehend betrachtet (MOORE, 1972; OBERWINKLER, 1977, 1982).

Dies wird durch den hohen Grad der Sequenzhomologie der 5S rRNAs von Ustilago violacea und Rhodosporidium toruloides bekräftigt. Ein starkes Abweichen im G+C-Gehalt der DNA im Vergleich zu den anderen Vertretern der Gattung wurde bei Rhodosporidium malvinellum festgestellt (NAKASE und KOMAGATA, 1971; BLANZ, unveröffentlicht). Es ist daher fraglich, ob dieser Organismus zu Recht in die Gattung Rhodosporidium gestellt wird.

Aufgrund der für Basidiomyceten ungewöhnlichen kettenförmigen Meiosporangien wurde die systematische Zugehörigkeit des Palmparasiten Graphiola phoenicis lange Zeit kontrovers diskutiert (FISCHER 1883, 1921; KILLIAN, 1924; HUGHES, 1953). OBERWINKLER et al. (1982) zeigten die Heterobasidiomycetennatur der Art und stellten sie in eine eigene Ordnung, die Graphiolales. Die Beziehungen zu den anderen Heterobasidiomyceten blieben jedoch unklar. Mit der Bestimmung der 5S rRNA Sequenz dieses Organismus wurde daher ein erneuter Versuch zur Lösung dieses systematischen Problems unternommen.

Die Tremellales nehmen mit ihren längsseptierten Phragmobasidien eine Sonderstellung innerhalb der Basidiomyceten ein. Die 5S rRNA Sequenz von Tremella mesenterica (WALKER und DOOLITTLE, 1982) deutet eine relative Nähe zu einigen Vertretern der Hetero- als auch zu den Homobasidiomyceten an. Beziehungen zu der parasitischen Familie der Carcinomycetaceen (OBERWINKLER und BANDONI, 1982b) und zu den Filobasidiales als auch die Einheitlichkeit dieser Gruppe, in der Vertreter mit unterschiedlichen Septenporen vorkommen, bleiben zu überprüfen.

Als eine Art Bindeglied zwischen den Hetero- und Homobasidiomyceten werden die Tulasnellales angesehen (OBERWINKLER, 1982). Aus diesem Grund wurden Vertreter ihrer beiden Familien Tulasnellaceae und Ceratobasidiaceae mit in die Untersuchungen aufgenommen.

Stellvertretend für die Ordnungen der gastroiden Homobasidiomyceten, die keine Anschlüsse an die Verwandtschaften der Agaricales oder Aphyllophorales erkennen lassen (OBERWINKLER, 1977, 1982), wurde der Birnenstäubling Lycoperdon pyriforme als bekannter Vertreter der Lycoperdales untersucht.

Die Zugehörigkeit von Microstroma juglandis zu den Basidiomyceten konnte von BLANZ (1977) gezeigt werden. OBERWINKLER (1978a) stellte die Art in die Ordnung der Cryptobasidiales und nahm verwandtschaftliche Beziehungen zu den ebenfalls parasitischen und Holobasidien besitzenden Exobasidiales an. Da die 5S rRNA Sequenzen von Exobasidium vaccinii und Tilletia controversa bereits bestimmt wurden (WALKER und DOOLITTLE, 1983) war bereits eine Vergleichsbasis bei der Untersuchung von Microstroma juglandis vorhanden.

Bei Taphrina deformans, dem Erreger der Kräuselkrankheit von Obstbäumen, findet man sowohl ein Ascus-ähnliches Meiosporangium, als auch ein dikaryotisches Mycel, wie es für Basidiomyceten typisch ist (MARTIN, 1940; SYROP, 1975). Aus diesem Grund ist es unklar, ob die Art den Asco- oder den Basidiomyceten zuzurechnen ist. Ebenso ungeklärte Verhältnisse liegen bei Kabatiella microsticta vor (BLANZ, 1977; von ARX, 1982). Aufgrund eines ähnlichen Befallsbildes wie bei Microstroma juglandis wird die Zugehörigkeit zu den Basidiomyceten vermutet (von ARX, 1982).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Liste der bearbeiteten Stämme

Die bearbeiteten Stämme sind in der folgenden Liste zusammengefaßt. Dabei geben die Großbuchstaben vor den Stammnummern die jeweilige Stammsammlung der Universität Tübingen im Lehrbereich Spezielle Botanik an: FO = Prof.Dr.F.OBERWINKLER; GD = Dr.G.DEML; PB = Dr. P.BLANZ. Stämme, die vom Centraalbureau voor Schimmelkultures in Baarn bezogen wurden, sind mit CBS bezeichnet. Bei den parasitischen Pilzen sind die jeweiligen Wirte, von denen sie isoliert wurden, angegeben.

1. Atractiella solani (Cohn & Schroet.) Oberw. & Bandoni, CBS 277.32
2. Ceratobasidium cornigerum (Bourd.) Rogers, FO 29225
3. Christiansenia pallida Hauerslev, FO 31621

4. Coleosporium tussilaginis (Pers.) Lev., GD 776, isoliert von Pinus sylvestris L.
5. Efibulobasidium albescens (Sacc & Malbr.) Wells, FO 34705
6. Endophyllum sempervivi (Alb. & Schw.) deBy., GD 778, isoliert von Sempervivum spec.
7. Exidia glandulosa Bull ex Fr., FO 25056
8. Farysia thuemenii (Fisch. v. Waldh.) Nannf., GD 1309, isoliert von Carex riparia Curt.
9. Ginanniella primulicola (Magnus) Ciferri, GD 1394, isoliert von Primula veris L.
10. Graphiola phoenicis (Moug.) Poiteau, PB 4349
11. Gymnosporangium clavariaeforme (Jacq.) DC, GD 855, isoliert von Crataegus spec.
12. Kabatiella microsticta Bubak, CBS 342.66, isoliert von Convallaria spec.
13. Lycoperdon pyriforme Schaeff. ex Pers., FO 23332
14. Microstroma juglandis (Bereng.) Sacc., PB 4142, isoliert von Juglans regia L.
15. Phleogena faginea (Fries) Link, FO 24396
16. Platygloea peniophorae Bourd. & Galz., FO 22315
17. Puccinia poarum Niels., GD 830, isoliert von Tussilago farfara L.
18. Rhodosporidium malvinellum Fell & Hunter, CBS 6082
19. Septobasidium carestianum Bres., FO 25109
20. Sphacelotheca polygoni-persicariae, GD 1127, isoliert von Polygonum persicaria L.
21. Taphrina deformans (Berk.) Tul., PB 3713, isoliert von Prunus persicaria Baltsch cult. "pink charming"
22. Tulasnella violea (Quel.) Bourd. & Galz., FO 29326
23. Ustilago hordei (Pers.) Lagerheim, GD 935, isoliert von Hordeum spec.
24. Ustilago longissima (Schlechtendahl) Meyen, GD 666, isoliert von Glyceria maxima (Hartm.) Holmb.
25. Ustilago maydis (DC) Corda, GD 1042, isoliert von Zea mays L.
26. Ustilago scabiosae (Sow.) Winter, GD 1425, isoliert von Knautia arvensis L.
27. Uthatobasidium fusisporum (Schroet.) Donk, FO 25106

2.1.2 Chemikalien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt bezogen. Wenn nicht anders angegeben, wurden stets p. A. Qualitäten verwendet.

Bio-Rad Laboratories, Richmond USA: Acrylamid zweimal kristallisiert; Bromphenolblau; N,N'-Methylen-bis-acrylamid; N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin (TEMED); Xylencyanol.

Boehringer GmbH, Mannheim: Adenosin-5'-triphosphat; Adenosin-5'-diphosphat; Adenosin-3'-monophosphat; Cytidin-3'-monophosphat; Dithiotreitol; L-Glycerin-3-phosphat; Guanosin-3'-monophosphat; ß-Nicotinamid-adenin-dinukleotid; Pyruvat; t-RNA aus Hefe; Uridin-3'-monophosphat.

Difco Laboratories, Michigan USA: Hefeextrakt; Malzextrakt; Soytone.

New England Nuclear Chemicals, Boston, Mass. USA: (32-P)-Orthophosphat, säurefrei, NEX 53

Serva Feinbiochemica, Heidelberg: Ammoniumpersulfat; Acrylamid; Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

Sigma Chemical Company, Taufkirchen b. München: Trizma Base (Tris-Base); Trizma Hydrochlorid (Tris-HCl)

2.1.3 Enzyme

Boehringer GmbH, Mannheim: Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm; Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase; Hexokinase; Lactat-Dehydrogenase; Nuklease P1 aus *Penicillium citrinum*; 3-Phosphoglyceratkinase; 5'-Polynukleotidkinase aus T4-Phagen infizierten *E.coli*; RNase T1 aus *Aspergillus oryzae*; RNase U2 aus *Ustilago sphaerogena*; Triosephosphatisomerase.

Bethesda Research Laboratories (BRL), Neu Isenburg: RNase Bc aus Bacillus cereus; RNase U2 aus Ustilago sphaerogena.

Deutsche Pharmacia GmbH, Freiburg: RNA-Ligase, RNase frei; RNase PhyM aus Physarum polycephalum.

Partiell gereinigte RNase CL3 aus Hühnchenleber zur RNA-Sequenzierung wurde uns freundlicherweise von Prof. Hans J. Gross, Universität Würzburg überlassen.

2.1.4 Nährmedien

I. Medium I nach SUNDSTRÖM (1964)

Lösung A:

D-Glucose	20,0 g
L-Asparagin	1,4 g
KH_2PO_4	0,35 g
K_2HPO_4	0,15 g
$Na_2SO_4 \times 10\ H_2O$	0,5 g
Thiamin	0,1 mg
Aqua bidest.	1000 ml

pH 4,0 mit HCl konz.

Lösung B:

$CaCl_2$	0,1 g
$MgCl_2 \times 6\ H_2O$	0,41 g
Eisencitrat	5,41mg
Citrat	5,31mg
$MnSO_4 \times 4\ H_2O$	4,43mg
$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	4,05mg
Aqua bidest.	50,0 ml

Die Lösungen A und B werden getrennt autoklaviert und dann im Verhältnis 20 : 1 gemischt.

II. MYP-Medium: 7g Malzextrakt; 0,5g Hefeextrakt (Difco); 1 g Soyton mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

2.1.5 Puffer und Lösungen

Zellaufschlußpuffer

10 mM Tris/HCl, pH 7.2; 5 mM Mg-Acetat; 30 mM KCl.

Elektrophoresepuffer für SDS-Gele zur Trennung der Nukleinsäuren

100 mM Tris/Borsäure, pH 7,5; 1 mM EDTA; 0,1% SDS (Gew.%). Der Puffer wurde 5-fach konzentriert angesetzt und vor Gebrauch mit Aqua dest. verdünnt.

Loading-Solution für SDS-Gele

100 mM Tris/Borsäure, pH 7,5; 1mM EDTA; 0,1% SDS (Gew.%); 5% Glycerin (Vol.%); 0,04% Xylencyanol

Acrylamidstammlösung

15% Acrylamid : Bisacrylamid im Verhältnis 19:1 in Aqua bidest. gelöst

Acrylamidgellösungen für SDS-Gele

3,2% bzw. 10% Acrylamid aus der Acrylamidstammlösung. 1 x Elektrophoresepuffer aus der 5-fach konzentrierten Lösung. Das verbleibende Volumen wurde mit Aqua bidest. aufgefüllt.

Gelelutionspuffer

0.5 M Ammoniumacetat; 0,1 mM EDTA; 1 mM $MgCl_2$; 0,1% SDS.

Carrier-tRNA-Lösung zum Ausfällen von RNA

10 mg tRNA/ml in TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA). Die Lösung wurde jeweils 3x mit Phenol, 1x mit Chloroform und 1x mit Diäthyläther extrahiert, um RNasen zu eliminieren.

Elektrophoresepuffer für denaturierende Polyacrylamidgele

50 mM Tris/Borsäure, pH 8,3; 1 mM EDTA. Der Puffer wurde 10-fach konzentriert angesetzt und vor Gebrauch mit Aqua dest. verdünnt.

Loading-Solution für denaturierende Polyacrylamidgele

50 mM Tris/Borsäure, pH 8,3; 1 mM EDTA; 8 M Harnstoff; 0,04% Bromphenolblau; 0,04% Xylencyanol.

Acrylamidlösung für denaturierende Gele

Acrylamid : Bisacrylamid (19:1); 8,3 M Harnstoff (50 Gew.%); 10 Vol.% 10-fach konzentrierter Elektrophoresepuffer für Sequenzierungsgele. Das Gemisch wurde mit Aqua bidest. auf das entsprechende Volumen aufgefüllt.
Der pH-Wert der Lösung wurde durch Zugabe von kristalliner Borsäure auf 8,3 eingestellt.

Reagenzien und Puffer für die Synthese von (γ-^{32}P)-ATP

R-Puffer:	0,5 M Tris/HCl, pH 9,0	500 µl
	0,3 M $MgCl_2$	200 µl
	0,1 M Dithiothreitol	300 µl
	2,4 mM L-Glycerin-phosphat	250 µl
	10,0 mM NAD	250 µl
	2,0 mM ADP	125 µl
	Aqua bidest.	125 µl

R-Mix: 37,5 µl R-Puffer + 2,5 µl einer 40 mM, frisch angesetzten Natriumpyruvatlösung

Enzymstammlösung:

Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (180U/mg; 2 mg/ml)	35 µl
Triosephosphat-Isomerase (5000 U/mg; 2 mg/ml)	1 µl
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (80 U/mg; 10 mg/ml)	20 µl
3-Phosphoglycerat-Kinase (450 U/mg; 10 mg/ml)	2 µl
Lactat-Dehydrogenase (550 U/mg; 5mg/ml)	20 µl

E-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 9,0
5 mM Dithiothreitol

E-Mix: 10 µl der Enzymstammlösung wurden 5 min bei 12000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 140 µl E-Puffer aufgenommen.

Aufbewahrungspuffer und Inkubationspuffer für die zur Sequenzierung eingesetzten RNasen

Alle Inkubationspuffer enthielten zusätzlich 0.03% Xylencyanol als Farbstoffmarker für die Elektrophorese.

1. RNase Bc

Aufbewahrungspuffer (-20°C): 25 mM Na-Citrat, pH 5,0 mit Citrat; 1 mM EDTA; 50% Glycerin (V/V); Die verwendete Stammlösung hatte eine Konzentration von 2 U/µl.

Inkubationspuffer: 25 mM Na-Citrat, pH 5,0 mit Citrat; 1 mM EDTA.

2. RNase CL3

Aufbewahrungspuffer (-20°C): 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4, pH 6,0; 50% Glycerin (V/V). Die verwendete Stammlösung hatte eine Konzentration von 0,04 U/µl.

Inkubationspuffer: 20 mM Na-Citrat, pH 6,5 mit Citrat; 1 mM EDTA; 7 M Harnstoff.

3. RNase PhyM

Die als Lyophilisat gelieferte RNase wurde in Aqua bidest. aufgenommen und in einer Konzentration von 1 U/µl bei 4°C gelagert.

Inkubationspuffer: 20 mM Na-Citrat, pH 5,0 mit Citrat; 1 mM EDTA; 8,3 M Harnstoff (50 Gew.%).

4. RNase T1

Die RNase wurde mit Aqua bidest. auf eine Konzentration von 5U/µl verdünnt und bei -20°C gelagert.

Inkubationspuffer: wie bei der RNase PhyM

5. RNase U2

Die von Boehringer Mannheim als Lyophilisat gelieferte RNase wurde in Aqua bidest. aufgenommen und in einer Konzentration von 4 U/µl bei 4°C gelagert.

Aufbewahrungspuffer für die von BRL gelieferte RNase: 10 mM Na-Acetat, pH 6,0 mit Eisessig; 50% Glycerin (V/V). Die verwendete Stammlösung hatte eine Konzentration von 2 U/µl.

Inkubationspuffer für die RNase von BRL: 25 mM Citrat, pH 3,5 mit Na-Acetat; 1 mM EDTA; 7 M Harnstoff.

Für die RNase von Boehringer wurde derselbe Inkubationspuffer wie für die RNase PhyM verwendet.

Natriumcarbonatpuffer zur alkalischen Hydrolyse der RNA

50 mM $NaHCO_3$, pH 9,0 mit $NaCO_3$

2.1.6 Geräte und sonstige Materialien

Elektrophoresekammern	Eigenbau der Werkstatt
Filterpapier 3MM	Whatman Biochemicals
French Pressure Cell	Aminco
Kühlzentrifuge W 50 K	WKF
Netzgeräte	Bachofer, Isco, LKB
Röntgenfilme	Fuji Photo Film Co.
Spektralphotometer PMQ 3	Zeiss
Speed Vac Concentrator Model 100H	Savant
Tischzentrifugen	Eppendorf, Hettich
Transilluminator	Ultra-Violet Products
Verstärkerfolien für Röntgenfilme, Cronex Lightning Plus	Dupont & Co.

2.2 Methoden

Um die RNA vor ungewollten RNase-Einwirkungen zu schützen wurden bei den Arbeiten grundsätzlich Polyvinyl-Einmalhandschuhe getragen. Röhrchen, Eppendorfgefäße und Pipettenspitzen wurden vor Gebrauch 20 min bei 120°C autoklaviert. Alle Lösungen wurden mit frisch bidestilliertem Wasser angesetzt.

2.2.1 Anzucht der Pilzstämme

Für die Anzucht der Pilzstämme wurde das Medium I nach SUNDSTRÖM (1964) bevorzugt, weil es als RNA-freies Minimalmedium keine RNasen induziert, welche die Ausbeuten an 5S rRNA vermindern könnten. Für die unter 2.1.1 angegebenen Stämme mit den Nummern 4,6,8-11,14,16-19,21,23 und 26 wurde dieses Medium verwendet. Die anderen Stämme wurden in MYP-Medium angezogen.

Die Stämme wurden von Schrägagarröhrchen in 50 ml Erlenmeyerkölbchen mit 10 ml Medium überimpft und in einer Rotationsschüttelmaschine bei 22°C und Dauerlicht inkubiert bis ein deutliches Wachstum feststellbar war. Der Inhalt des Kölbchens wurde dann zum Animpfen von 150 ml Medium in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit seitlichem Einstich verwendet. Die Inkubation erfolgte wiederum bei 22°C. Die hefeartig wachsenden Basidiomyceten wurden in der logarithmischen Wachstumsphase, die je nach Organismus nach ein bis vier Tagen erreicht war, geerntet. Mycelien konnten einfach aus dem Medium abfiltriert werden und wurden durch Nachspülen mit Zellaufschlußpuffer gewaschen. Hefen wurden durch 10 min Zentrifugation bei 4°C und 5000 g geerntet. Das Pellet wurde in Zellaufschlußpuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert und das Pellet in einem möglichst kleinen Volumen Zellaufschlußpuffer aufgenommen. Die Zellen konnten bei -20°C gelagert werden.

2.2.2 Fällung von Nukleinsäuren

Alle Nukleinsäurefällungen wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen einer 3 M Natriumacetatlösung, 2 Volumina absoluten Ethanols und anschließende Inkubation bei -70°C durchgeführt. Es wurde solange inkubiert, bis die 70% alkoholische Lösung völlig abgekühlt und in einen viskosen Zustand übergegangen war. Dies dauerte bei kleinen Volumina in Eppendorfgefäßen etwa 15 min, bei größeren Volumina entsprechend länger.

2.2.3 Polymerisation von Acrylamidgelen

Zur Polymerisation von 3 mm dicken SDS-Gelen wurden 30 ml Acrylamidlösung 20 µl TEMED und 200 µl einer 10% (Gew.-%) Ammoniumpersulfatlösung zugesetzt. Die Polymerisation der 0,4 mm dicken, denaturienden Harnstoffgele erfolgte mit 20 µl TEMED und 500 µl der 10% Ammoniumpersulfatlösung pro 100 ml Gellösung.

2.2.4 Lyse der Zellen und Extraktion der Nukleinsäuren

Die Zellen wurden bei 800 bar mit einer bei 4°C vorgekühlten French pressure cell lysiert. Das Zellysat (3-4 ml) wurde direkt in ein Röhrchen mit 4ml eiskaltem, puffergesättigtem (1M Tris/HCl, pH 8,0) Phenol eingeleitet. Um die Phasen zu vermischen, wurde das Röhrchen sofort geschüttelt und dann auf Eis gestellt. Mittels anschließender 20 min Zentrifugation bei 4°C und 10000 g ließ sich das Gemisch wieder in zwei Phasen trennen. Die obere, die Nukleinsäuren enthaltende wäßrige Phase wurde abgenommen und erneut auf die gleiche Weise phenolisiert. Der Vorgang wurde so oft wiederholt, bis an der Phasengrenze keine denaturierten Proteine mehr zu sehen waren. Um Spuren von Phenol aus der wäßrigen Phase zu entfernen, wurde die Lösung mit dem gleichen Volumen Chloroform geschüttelt und wie oben zentrifugiert. Anschließend wurden die Nukleinsäuren gefällt und durch 10 min Zentrifugation bei 4°C und 10000 g pelletiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet unter Vakuum getrocknet.

2.2.5 Isolierung der 5S rRNA

Die 5S rRNA wurde durch präparative Gelelektrophorese isoliert. Dabei erfolgte die Trennung der Nukleinsäuren nach ihrer Größe in einem zweischichtigen SDS-Polyacrylamidgel (15 x 15 x 0.3 cm). Die obere Gelschicht wurde mit 3,2% so gewählt, daß auch die 18S und die 28S ribosomalen RNAs während der Elektrophorese ins Gel wandern und so ein Verstopfen der Geltaschen vermieden wird. Die Trennung der 5,8S, 5S und tRNAs erfolgte in der unteren 10% Gelschicht. Das Nukleinsäurepellet wurde in einem möglichst kleinen Volumen der Loading-Solution (400 - 800 µl) aufgenommen. In jede der drei 3,3 cm breiten Geltaschen wurden

dann 200 - 400 µl dieser Lösung geladen. Die Elektrophorese dauerte bei konstant 25V etwa 16 - 18 Stunden. Sie wurde beendet, wenn der Xylencyanol-Farbstoffmarker etwa die Mitte der unteren Gelschicht erreicht hatte. Zur Lokalisation der Nukleinsäuren wurde das Gel anschließend auf eine in Haushaltsfolie eingeschlagene Dünnschichtplatte mit Floureszensindikator gelegt und unter UV-Licht von 254 nm betrachtet. Abb.1 zeigt die Auftrennung der ribosomalen RNAs in einem solchen Gel. Die 5S rRNA-Bande wurde nun mit einem Spatel ausgeschnitten und in ein 12 ml Plastikröhrchen transferiert. Dabei wurde das Gelstückchen an der Wand des Röhrchens zerrieben. Die Elution der RNA erfolgte passiv durch Diffusion. Dazu wurden die Gelstückchen mit 1,5 ml Gelelutionspuffer überschichtet und bei Raumtemperatur belassen. Nach 3 Stunden wurde der Elutionspuffer abgenommen und durch 1,5 ml frischen Puffer ersetzt. Nach weiteren 3 Stunden wurden die Überstände vereinigt und die 5S rRNA gefällt. Anschließend wurde die Nukleinsäure durch 20 min Zentrifugation bei 4°C und 12000 g pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet unter Vakuum getrocknet. Die 5S rRNA wurde nun in 300 µl H_2O bidest. aufgenommen. Noch verbliebene Polyacrylamidstückchen ließen sich durch 5 min Zentrifugation bei 12000 g abtrennen. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zur Konzentrationsbestimmung im Photometer wurde ein Aliquot von 15 µl entnommen (siehe 2.2.6). Anschließend wurde die 5S rRNA erneut gefällt. Eine weitere Reinigung des Pellets erfolgte durch Waschen mit 500 µl 70% Ethanol. Nach nochmaliger Zentrifugation und Abnehmen des Überstandes wurde das 5S rRNA Pellet in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

2.2.6 Konzentrationsbestimmung der RNA im Photometer

Wie unter 2.2.5 angegeben wurde ein Aliquot der in Aqua bidest. aufgenommenen, von Polyacrylamidstückchen gereinigten 5S rRNA zur Konzentrationsbestimmung im Photometer verwendet. Dazu wurde die Extinktion der Probe bei 260 nm gegen Aqua bidest. als Leerwert gemessen. Die RNA-Ausbeute wurde aus der folgenden Beziehung (nach BROWNLEE, 1972) unter Berücksichtigung der Verdünnung der Probe und des verbleibenden Volumens ermittelt:

$$1\ A_{260} = 40\ \mu g\ RNA/ml$$

Abbildung 1: Photographie eines zweischichtigen, unter UV-Licht von 254 nm betrachteten Polyacrylamidgels, wie es zur Präparation der 5S rRNA verwendet wurde.

2.2.7 Synthese von (γ-^{32}P)-ATP

Die Synthese von (γ-^{32}P)-ATP wurde nach der von UHLENBECK (pers. Mitteilung) abgeänderten Methode von JOHNSON und WALSETH (1979) durchgeführt. Dabei wird in vitro die Substratkettenphosphorylierungsreaktion der Glykolyse nachvollzogen und organisches (^{32}P)-Phosphat auf ADP übertragen. Zur Synthese wurden ^{32}P-Orthophosphat, der R-Mix und der E-Mix im Verhältnis 5 : 4 : 1 in einem Gesamtvolumen von 40 µl zusammenpipettiert. Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei 25°C inkubiert. Auf einer PEI-Cellulose-Dünnschichtfolie (15 x 5 cm) als Träger und einer 0,8 M Ammoniumsulfatlösung als Laufmittel erfolgte mit einem Aliquot des Ansatzes eine Erfolgskontrolle durch Dünnschichtchromatographie. Der R_f-Wert von (γ-^{32}P)-ATP beträgt in diesem System etwa 0,3, der von ^{32}P-Orthophosphat etwa 0,8. In der Regel wurde das ^{32}P-Orthophosphat vollständig in (γ-^{32}P)-ATP umgesetzt, so daß nur ein schwarzer Fleck auf der von der Dünnschichtfolie angefertigten Autoradiographie vorhanden war. Das (γ-^{32}P)-ATP wurde lyophilisiert und in Aliquots bei -20°C gelagert.

2.2.8 Synthese von 5'-(^{32}P)-pCp für die 3'-Markierung von RNA

Die Methode zur Herstellung von 5'-(^{32}P)-pCp wurde von KRUPP und GROSS (1983) übernommen. Dazu wurden 2 µl pCp-Puffer, 1 µl 1mM Cytidin-3'-monophosphat und 1 µl Polynukleotidkinase (4,5 U) auf 50 - 200 µCi lyophilisiertes (γ-^{32}P)-ATP pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde 60 min bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der Polynukleotidkinase erfolgte durch 4 min Inkubation des Ansatzes bei 90°C und anschließendes schnelles Abkühlen im Eis. Zur Erfolgskontrolle wurde eine Dünnschichtchromatographie wie unter 2.2.5 durchgeführt. In der Regel wurde die Radioaktivität vollständig vom (γ-^{32}P)-ATP auf das 5'-(^{32}P)-pCp (R_f-Wert 0,6) übertragen. Das 5'-(^{32}P)-pCp wurde sofort nach der Synthese verwendet.

2.2.9 3'-(^{32}P)-Markierung der 5S rRNA

Bei der 3'-Markierung ligiert das Enzym RNA-Ligase 5'-(^{32}P)-pCp an die 3'-OH-Gruppe der RNA. Die RNA-Markierung wurde wie von KRUPP und GROSS

(1983) beschrieben durchgeführt. Dazu wurde folgender Reaktionsansatz zusammenpipettiert:

1 µl	1 M HEPES-Puffer, pH 8,3 mit HCl
1,5 µl	0,2 M $MgCl_2$
1 µl	66 mM Dithiothreitol
1,5 µl	0,1 mM ATP
1 µl	Dimethylsulfoxid
2 µl	5S rRNA (1 - 5 µg)
4 µl	RNA-Ligase (8 U)
2 µl	5'-(32p)-pCp (50 µCi)

Die Inkubation des Ansatzes erfolgte 18 Stunden bei 4°C. Dann wurde die RNA zusammen mit 10 µg Carrier-tRNA gefällt. Die Nukleinsäuren wurden durch 10 min Zentrifugation bei 12000 g pelletiert. Nach der Abnahme des Überstandes wurde die RNA mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde unter Vakuum getrocknet.

2.2.10 Dephosphorylierung der 5S rRNA

Bevor die 5S rRNA am 5'-Ende mit (^{32}P) markiert werden kann, muß zunächst das 5'-Phoshat entfernt werden. Dies geschieht durch die Behandlung mit Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm. Dazu wurde die lyophilisierte RNA in 50 µl 50mM Tris/HCl pH 8,0 aufgenommen. Die Alkalische Phosphatase wurde mit demselben Puffer auf eine Konzentration von 0,02 Einheiten pro µl verdünnt. Ein µl dieser verdünnten Lösung wurde für den Verdau eingesetzt. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte 2 Stunden bei 37°C. Anschließend wurde die Alkalische Phosphatase durch 3 min Erhitzen auf 90°C und schnelles Abkühlen im Eis denaturiert. Der Ansatz wurde in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

2.2.11 5'-(^{32}P)-Markierung der dephosphorylierten 5S rRNA

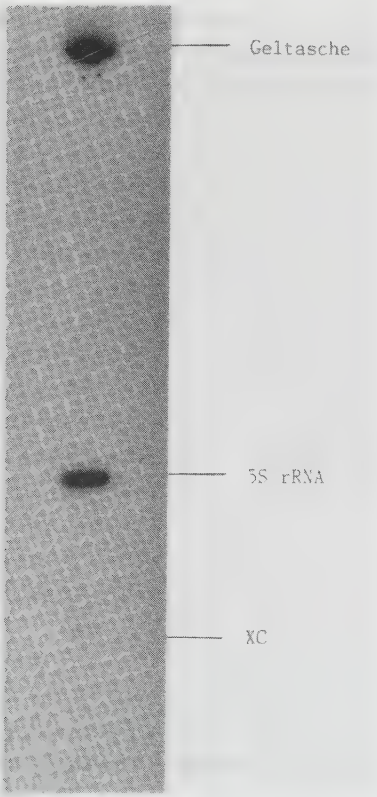
Bei der 5'-Markierung von RNA überträgt das Enzym Polynukleotidkinase die (^{32}P)-Phosphorsäure vom (γ-^{32}P)-ATP auf die 5'-OH-Gruppe der dephosphorylierten Nukleinsäure. 1 - 5 µg dephosphorylierte 5S rRNA wurden in 23 µl H_2O bidest., 1 µl 500 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,2 M $MgCl_2$,

32 mM Spermidin und 1 µl 0,3 M Mercaptoethanol aufgenommen. Da dies dem halben Volumen wie bei der Dephosphorylierung entspricht, ist die Pufferkonzentration jetzt 100 mM Tris/HCl pH 8,0. Um das 5'-Ende freizulegen wurde der Ansatz 2 min bei 90°C erhitzt und anschließend auf Eis gestellt. Dann wurden 0.5 µl Polynukleotidkinase (=2,25 U) zugegeben und der ganze Ansatz auf 50 µCi lyophilisiertes (γ-^{32}P)-ATP pipettiert. Die Inkubation erfolgte 30 min bei 37°C. Nun wurde die markierte 5S rRNA zusammen mit 10 µg Carrier-tRNA ausgefällt und anschließend 10 min bei 12000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Abnahme des Überstandes wurde das Pellet unter Vakuum getrocknet.

2.2.12 Reinigung der (^{32}P)-markierten 5S rRNA durch Gelelektrophorese

Zur Abtrennung von RNA-Bruchstücken und nicht eingebauter Radioaktivität muß eine weitere Reinigung der 5S rRNA durch Gelelektrophorese erfolgen. Hierzu wurde ein 8%-iges, denaturierendes Polyacrylamidgel (38 x 20 x 0.04 cm) verwendet. Um das Gel zu erwärmen, erfolgte eine 20 min Vorelektrophorese bei konstant 1400 V. In der Zwischenzeit wurden die Proben in 6 µl der Loading-Solution für denaturierende Polyacrylamidgele aufgenommen. Durch 2min Erhitzen auf 90°C und anschließendes schnelles Abkühlen im Eis wurde die RNA denaturiert. Vor dem Auftragen der Proben muß zunächst der in die Taschen (0,8 cm breit) diffundierte Harnstoff ausgespült werden. Dies geschieht am besten mit einer Pasteurpipette. Die Elektrophorese erfolgte bei 32 W (ca. 1500 V und 23 mA), so daß die Oberfläche der Glasplatte sich auf etwa 60°C erhitzte und im Gel denaturierende Bedingungen herrschten. Wenn der Bromphenolblau-Farbstoffmarker etwa 30 cm zurückgelegt hatte, wurde die Elektrophorese beendet. Die obere Glasplatte wurde entfernt und das Gel mit Haushaltsfolie bedeckt. In einer 15 - 30 min Expositionszeit wurde eine Autoradiographie angefertigt (Abb.2). Der Röntgenfilm und das Gel wurden nun zur Deckung gebracht. Dabei wurde der Film unter die Glasplatte gelegt, so daß das die 5S rRNA enthaltende Gelstückchen von oben ausgeschnitten werden konnte. Das Gelstückchen wurde in ein Eppendorfgefäß transferiert. Die Elution der 5S rRNA erfolgte zweimal zwei Stunden mit je 150 µl Gelelutionspuffer. Anschließend wurde die markierte RNA zusammen mit 15 µg Carrier-tRNA ausgefällt, mit 500 µl 70%

Abbildung 2: Autoradiographie eines denaturierenden 8% Polyacrylamidgels zur Reinigung der (^{32}P)-markierten 5S rRNA. Die Position des Xylencyanol-Farbstoffmarkers ist mit XC bezeichnet.



Ethanol gewaschen und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Als Maß für die eingebaute Radioaktivität wurden die Cerenkov-Counts mit dem ß-Counter gemessen. Es ergaben sich üblicherweise Werte zwischen 5×10^5 bis 4×10^6 cpm für die 5'- und die 3'-Markierung.

2.2.13 Sequenzierung der 5S rRNA

Die Sequenzierung der 5S rRNA wurde nach der von DONIS-KELLER et al. (1977) und DONIS-KELLER (1980) beschriebenen, enzymatischen Methode vorgenommen. Dabei wird die radioaktiv-endmarkierte RNA mittels nukleotidspezifischer RNasen limitiert gespalten, so daß gleichmäßig Bruchstücke aller möglichen Längen entstehen. Anschließend werden die Reaktionsansätze gleichzeitig nebeneinander in denaturierenden Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Von diesen Gelen werden Autoradiographien angefertigt. Aus den auf Röntgenfilmen sichtbar gemachten Bandenmustern läßt sich die jeweilige Nukleotidsequenz der RNA direkt ablesen. Um die Ablesesicherheit zu erhöhen, werden die spezifischen RNase-Spaltungen durch eine unspezifische Alkalispaltung der RNA ergänzt. Zusätzlich zu den von DONIS-KELLER beschriebenen Abbaureaktionen mit den RNasen T1 (G-spezifisch), U2 (A-spezifisch) und PhyM (A + U spezifisch), wurden die Enzyme Bc (C + U spezifisch; LOCKARD et al., 1978) und CL3 (C-spezifisch; BOGUSKI et al., 1980; LEVY und KARPETZKY, 1980) verwendet. Da alle verwendeten Enzyme die RNA hinter dem 3'-Phosphat des jeweiligen Nukleotids spalten, kann das 3'-terminale Nukleotid nicht mit dieser Methode bestimmt werden, weil das entsprechende Bruchstück keine radioaktive Markierung trägt. Das 3'-terminale Nukleotid wurde daher separat in einem anderen Experiment bestimmt (siehe 2.2.15).

Limitierte RNase Spaltungen

Die mit 10 µg Carrier-tRNA getrocknete, entweder 3'- oder 5'-markierte RNA wurde in 105 µl H_2O bidest. aufgenommen. Dieses Volumen wurde in 5 Portionen zu je 10 µl für die RNase-Spaltungen und 20 µl für die Alkalispaltung aufgeteilt. Die restlichen 35 µl sollten für eine eventuelle Wiederholung der Sequenzierungsreaktionen und für die Bestimmung des 3'-terminalen Nukleotids verbleiben. Die Proben wurden anschließend in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

Die folgenden RNase-Konzentrationen wurden nach der von DONIS-KELLER et al. (1977) beschriebenen Methode als optimal für die aufgeführten Bedingungen ermittelt. Für die Spaltungen wurden die Enzymstammlösungen mit ihren jeweiligen Reaktionspuffern so verdünnt, daß sich folgende Konzentrationen bezogen auf 5 µl ergaben.

RNase Bc	0,8 U
RNase CL3	0,04 U
RNase PhyM	0,75 U
RNase T1	5,0 U
RNase U2 (BRL)	0,25 U
oder	
RNase U2 (Boehringer)	0,4 U

Je 5 µl dieser RNase-Lösungen wurden auf die getrocknete RNA pipettiert. Die Inkubation der Ansätze erfolgte 15 min bei 55°C. Die Reaktionen wurden durch ein Überführen der Eppendorfgefäße in Trockeneis gestoppt.

Limitierte alkalische Hydrolyse der RNA

Auf die getrocknete RNA wurden 4 µl alkalische Natriumcarbonatlösung pipettiert. Die Spaltung erfolgte 10 min bei 90°C und wurde im Eis gestoppt.

2.2.14 Trennung der Spaltprodukte in denaturierenden Polyacrylamidgelen

Die Proben mit der limitiert degradierten RNA wurden in denaturierenden Polyacrylamidgelen (75 oder 38 x 40 x 0,04 cm) verschiedener Konzentrationen aufgetrennt. Die Bandenmuster, aus denen die jeweilige Nukleotidsequenz direkt abgelesen werden konnte, wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht (siehe Abb. 3). Zum Vorwärmen der Gele erfolgte eine 30 min Vorelektrophorese bei konstant 1400 V. Die Elektrophorese der Proben wurde bei konstant 42 W bei 38 cm langen Gelen bzw. bei konstant 85 W bei 75 cm langen Gelen durchgeführt. Dabei wurde darauf geachtet,

daß zu jeder Zeit denaturierende Bedingungen, d.h. eine Temperatur von etwa 70°C im Gel und etwa 60°C auf der Oberfläche der Glasplatte herrschte. Dies wurde mit der Hand kontrolliert und durch den Stromfluß eventuell korrigiert. Die Proben wurden mit der Loading-Solution auf ein Volumen von 10 µl gebracht und in zwei Portionen zu je 5 µl aufgeteilt. Bei der Loading-Solution wurde auf den Bromphenolblau-Farbstoffmarker verzichtet, da der Salzcharakter des Farbstoffs den Lauf der kurzen Nukleotide beeinflussen kann (KRUPP, 1983, persönliche Mitteilung). Bis zum Laden wurden die Proben bei -20°C aufbewahrt. Jeweils eine Portion sollte dazu dienen, die 5'- oder 3'-Enden des Moleküls vom ersten bzw. letzten Nukleotid an zu bestimmen, die zweiten Portionen sollten den dazwischen liegenden Bereich abdecken. Zur Bestimmung der Enden wurden 38 cm lange 12-, 15- oder 20% Polyacrylamidgele verwendet. Je höher die eingesetzte Acrylamidkonzentration war, desto besser wurden die ersten Nukleotide voneinander getrennt, konnten jedoch auch weniger Nukleotide pro Spur gelesen werden. In diesen Gelen wanderte das erste Nukleotid etwa dreimal so schnell wie der Xylencyanol(XC)-Marker. Bei 12%-Gelen konnten nach etwa 2-stündiger Elektrophorese in der Regel die Nukleotide 1 - 40 gelesen werden. Die Nukleotide 30 - 80 waren getrennt, wenn der XC-Marker nach 5 Stunden etwa 30 cm zurückgelegt hatte, was zu einer Überlappung von 40 Nukleotiden der vom 5'-Ende mit der vom 3'-Ende sequenzierten RNA führte. Mit 75 cm langen 8%-Polyacrylamidgelen ergaben sich größere Überlappungen. Auf ihnen konnten die Nukleotide 30-110 gelesen werden, wenn der XC-Marker etwa 40 cm gewandert war; dies dauerte etwa 5 Stunden. Nach beendeter Elektrophorese wurden die Gele auf 3MM Whatman-Papier transferiert und mit Haushaltsfolie bedeckt. Für die Autoradiographie wurden die Gele mit Verstärkerfolien exponiert. Die Expositionszeiten betrugen je nach eingebauter Radioaktivität zwischen 12 Stunden und 14 Tagen (siehe 2.2.17).

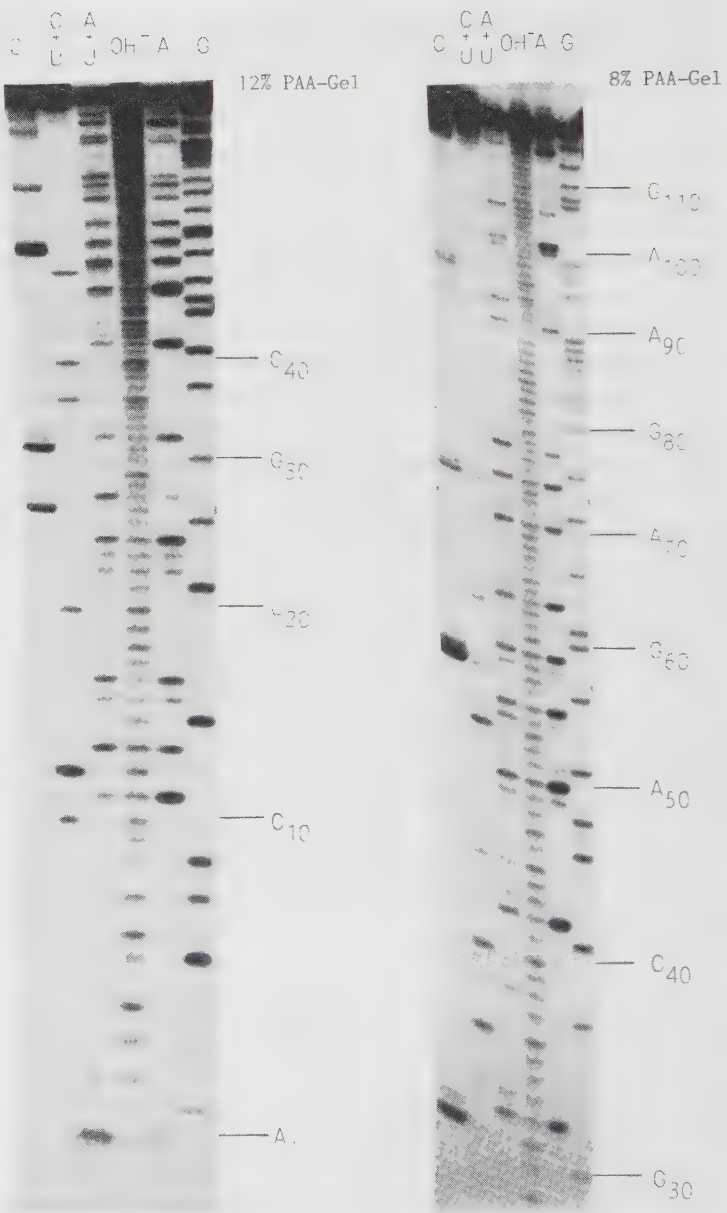
5S rRNAs mit heterogenen 3'-Enden

Wenn heterogene 3'-Enden vorlagen, zeigte sich dies in einer Überlappung der Bandenmuster auf den Autoradiographien der 3'-markierten RNA. In der Regel konnten dann nur wenige Nukleotide vom 3'-Ende aus bestimmt werden. In diesen Fällen wurden die Nukleotidsequenzen bei ent-

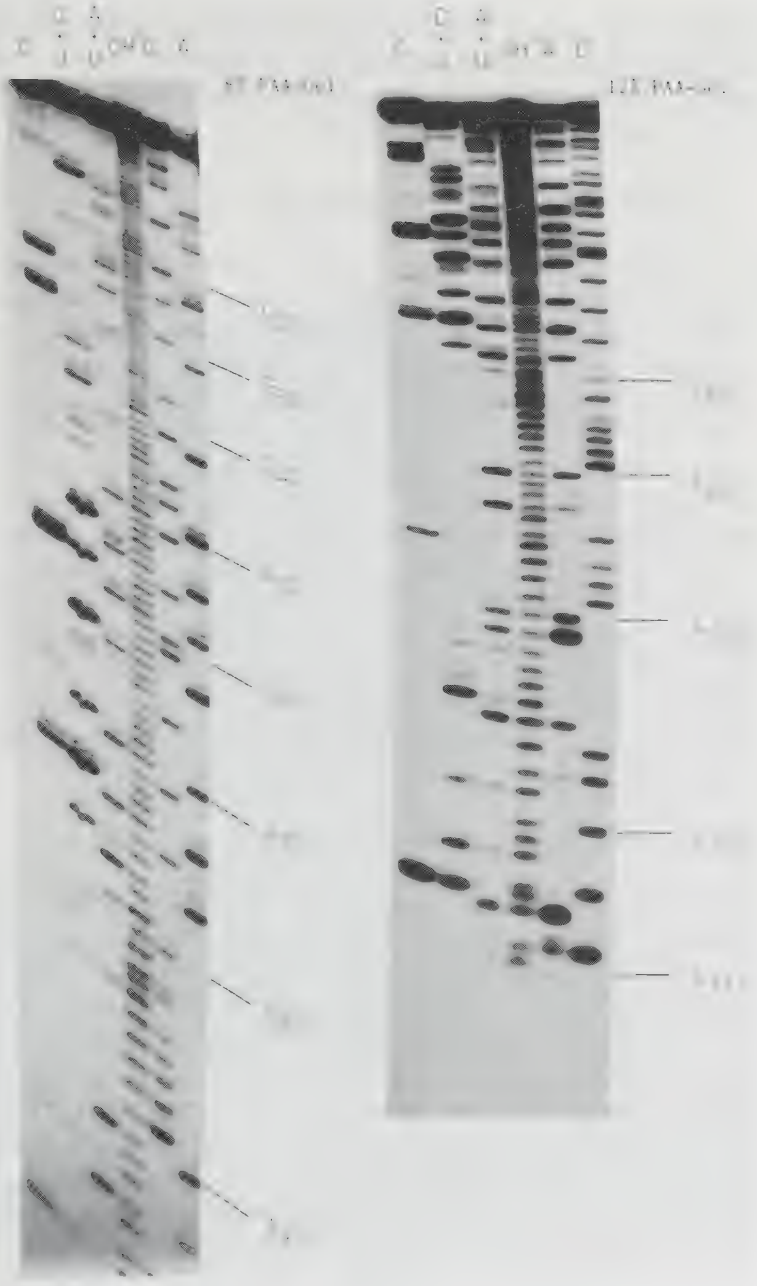
Abbildung 3: Autoradiographie der (^{32}P)-markierten 5S rRNA von Ustilago longissima, aus der die vollständige Nukleotidsequenz mit Ausnahme des 3'-terminalen Nukleotids "U-118" abgelesen werden kann.

Die RNA wurde nach der Methode von DONIS-KELLER abgebaut (siehe 2.2.13). Die Nukleotidsequenzen der Molekülenden wurden mittels eines 38 cm langen denaturierenden 12% Polyacrylamidgels bestimmt. Für den mittleren Molekülbereich wurde ein 75 cm langes denaturierendes 8% Polyacrylamidgel verwendet (siehe 2.2.14). Die Buchstaben über den Spuren geben die jeweilige Basenspezifität des verwendeten Enzyms an. Die limitierte alkalische Hydrolyse der RNA ist mit OH^- bezeichnet. Die Zahlen geben die jeweiligen Nukleotidpositionen an und beziehen sich auf die tatsächliche Länge des Moleküls. Das 3'-terminale Nukleotid "U-118" wurde separat bestimmt (siehe 2.2.15).

5'-(^{32}P)-markierte RNA



3'-(^{32}P)-markierte RNA



sprechend längerer Laufzeit der Elektrophorese vom 5'-Ende ausgehend bestimmt. Heterogene 3'-Enden können auch artifiziell durch die 3'-Phosphataseaktivität der Polynukleotidkinase entstehen. Es ist daher besonders darauf zu achten, daß dieses Enzym nach der Synthese von 5'-(^{32}P)-pCp inaktiviert wird (siehe 2.2.8).

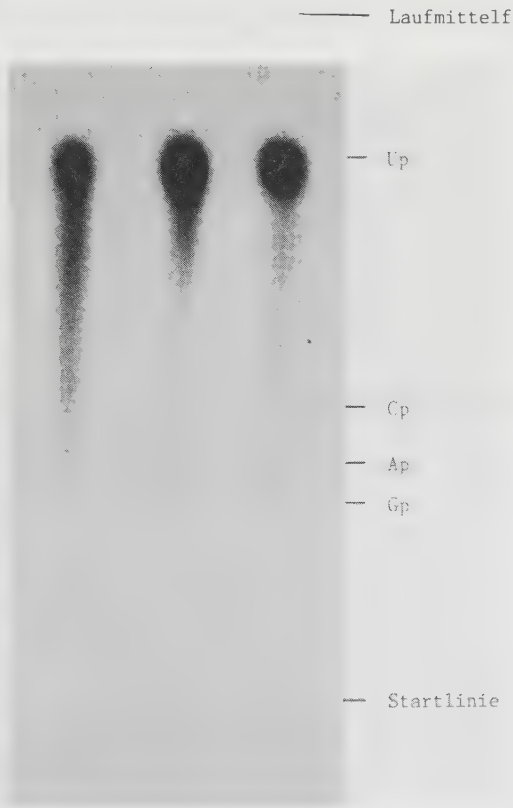
2.2.15 Bestimmung des 3'-terminalen Nukleotids

Das 3'-terminale Nukleotid wurde durch die vollständige alkalische Hydrolyse der 3'-(^{32}P)-markierten RNA und anschließende Dünnschichtchromatographie bestimmt. Dazu wurde ein Aliquot der markierten RNA mit 4 µl der alkalischen Natriumcarbonatlösung 60 min bei 90°C erhitzt. Im Laufe der Reaktion werden alle 5'-Zucker-Phosphat-Bindungen gespalten, so daß die (^{32}P)-Phosphorsäure vom 5'-(^{32}P)-pCp auf das 3'-terminale Nukleotid übergeht. Es entsteht ein 3'-(^{32}P)-markiertes Nukleosid. Der Reaktionsansatz wurde anschließend zusammen mit je 4 µl der vier in Frage kommenden 3'-Nukleosiden Ap, Cp, Gp und Up (1 µg/µl) als Markern auf eine Cellulose-Dünnschichtplatte (20 x 20 cm) aufgetragen. Als Laufmittel wurden Butanol, HCl konz. und Aqua bidest. im Verhältnis 14 : 3 : 3 verwendet. Nach etwa 16 Stunden wurde die Chromatographie beendet und die Platte unter dem Abzug getrocknet. Es wurde eine Autoradiographie angefertigt. Die Position des radioaktiven Nukleotids wurden nun mit denen der im UV-Licht bei 254 nm floureszierenden Markernukleotiden verglichen und so bestimmt (siehe Abb. 4).

2.2.16 Bestimmung des 5'-terminalen Nukleotids

Das 5'-terminale Nukleotid wurde in allen Fällen mit der Sequenzierungsmethode nach DONIS-KELLER eindeutig bestimmt. Es kann jedoch auch durch Dünnschichtchromatographie der mit der RNase P1 vollständig gespaltenen 5'-markierten RNA ermittelt werden. Die 5'-terminalen Nukleotide der 5S rRNAs von Atractiella solani, Kabatiella microsticta und Lycoperdon pyriforme wurde auf diese Weise zusätzlich bestätigt. Dazu wurde die RNase P1 in einer Konzentration von 1,25 µg/ml in 50 mM Ammoniumacetat, pH 5,3 angesetzt. Ein Aliquot der 5'-markierten RNA wurde mit 3 µl der RNase-Lösung bei 37°C in 60 min vollständig in Mononukleotide gespalten. Dabei trägt das erste Nukleotid die (^{32}P)-

Abbildung 4: Autoradiographie zur Bestimmung des 3'-terminalen Nukleotids (siehe 2.2.15).
Ap, Cp, Gp und Up bezeichnen die Positionen der nicht radioaktiven Marker-3'-Phospho-Nukleoside.



Phosphorsäure. Analog zur Bestimmung des 3'-terminalen Nukleotids (siehe 2.2.15) wurde das 5'-terminale Nukleotid bestimmt. Als Marker wurden die entsprechenden 5'-Nukleotide eingesetzt.

2.2.17 Expositionszeiten für Sequenzgele

Die folgenden Angaben sind Richtwerte für die Exposition der Sequenzgele mit Verstärkerfolie bei -70°C. Sie beziehen sich auf die Radioaktivitätsmenge, die pro Gelspur bezogen auf die RNase-Spaltungen eingesetzt wurden.

Radioaktivität	Expositionszeit
1500 Cpm	14 Tage
3000 Cpm	7 Tage
6000 Cpm	3 Tage
12000 Cpm	1 Tag
20000 Cpm	12 Stunden

2.2.18 Berechnung der KNUC-Werte und der Standard-Fehler

Die Berechnung der KNUC-Werte und der Standard-Fehler erfolgte nach KIMURA (1980).

Der KNUC-Wert wurde wie folgt berechnet:

$$KNUC = -1/2 \ln ((1 - 2P - Q)\sqrt{1 - 2Q})$$

P = Anzahl der Transversionen dividiert durch die Anzahl der verglichenen Nukleotidpositionen (dies entspricht der Anzahl der Nukleotide des längsten der verglichenen Moleküle)

Q = Anzahl der Transitionen dividiert durch die Anzahl der verglichenen Nukleotidpositionen

Der Standard-Fehler $Sigma_k$ wurde wie folgt berechnet:

$$Sigma_k = 1/\sqrt{n} \; (\sqrt{(a^2P + b^2Q) - (aP + bQ)^2} \;)$$

n = Anzahl der verglichenen Nukleotidpositionen

$a = 1/\ 1 - 2P - Q$

$b = 1/2 \; ((1/\ 1 - 2P - Q) \; + \; (1/\ 1 - 2Q))$

2.2.19 Konstruktion des in Abb. 6 dargestellten Dendrogramms

Die Konstruktion des in Abb. 6 dargestellten Dendrogramms erfolgte nach dem "average-linkage-Clustering" Verfahren.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten 5S rRNA Nukleotidsequenzen sind rechts in Tab. 1 zusammengefaßt.

Zusammen mit den in dieser Arbeit vorgelegten 5S rRNA Sequenzen sind insgesamt 57 Basidiomyceten in diesem Merkmal charakterisiert. Damit sind die Basidiomyceten die zur Zeit am besten untersuchte Gruppe der Eukaryonten in Bezug auf dieses Charakteristikum. Bevor die 5S rRNA Daten im Zusammenhang mit anderen Merkmalen der Basidiomyceten diskutiert werden, soll zum besseren Verständnis zunächst auf die Evolution auf molekularer Ebene sowie auf die verschiedenen Aspekte bei der Auswertung des Vergleichs von 5S rRNA Sequenzen eingegangen werden.

3.1 Evolution auf molekularer Ebene

3.1.1 Ursachen der molekularen Evolution

Die Evolution auf molekularer Ebene wird durch Mutationen verursacht, die durch ungerichtete genetische Drift hervorgerufen werden (KIMURA, 1968, 1969, 1980, 1983; KING und JUKES, 1969; LANGLEY und FITCH, 1974; SMITH und COSS, 1984). Während andere Merkmale konvergent entstehen oder auch im Laufe der Phylogenie wegen eines Selektionsvorteils unverändert bleiben können, findet auf molekularer Ebene eine kontinuierliche Evolution statt. Dabei unterliegen nur die unmittelbar funktionstragenden Bereiche der Moleküle einem Selektionsdruck, der ihre unveränderte Beibehaltung bewirkt. In nicht unmittelbar funktionstragenden bzw. nur eine räumliche Struktur aufrechterhaltenden Bereichen können jedoch neutrale Mutationen erfolgen, die weder einen Selektionsvorteil noch -nachteil mit sich bringen. Auf diese Weise ensteht ein Genpolymorphismus innerhalb einer Population. Mit einer geringen Wahrscheinlichkeit kann es nun zur Manifestierung von neutralen Mutationen im Genpool der Population und zu einer Substitution eines Allels kommen, die zu einer Veränderung der Sequenz eines Makromoleküls führen (KIMURA, 1969, 1983). Für eine Reihe von Proteinen und Nukleinsäuren konnte gezeigt werden, daß sich neutrale Mutationen während der Phylogenie in etwa proportional zur absoluten Zeit akkumulieren und daher

	10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 119
1. Platygloea peniophorae	AUCUGCGGCCAUACCGUGAUGAACAUUCCGCGUCCCGUCCGAUCCGCGC-AGACAAGCAUCACAGGGCCAGAGAGUAUUGACGUGGGUGACCAGUCGAGAACACUG-U-GCUGCCGCAGGU
2. Sphacelotheca polyg.-pers.	AUCUGCGGCCAUACCGCGAUGAACCUUCCGCGUCUCGUCCGAUCCGCGC-AGACAAGCAUCGCAGGGGCCAGAGAGUAUUGACGUGGGUGACCAGUCGAGAACACUG-U-GCUGCUGCAGGU
3. Ustilago scabiosae	AUCUGCGGCCAUACCGCGAUGAACCUUCCGCGUCUCGUCCGAUCCGCGC-AGACAAGCAUCGCAGGGGCCAGAGAGUAUUGACGUGGGUGACCAGUCGAGAACACUG-U-GCUGCCGCAGGU
4. Septobasidium carestianum	AUCUGGGGCCAUACCACAGUGAACACACCGCAUCCCGUCCGAUCUGCGC-AGUUAACCACUGUAGGGCCGAGUCAGUAGUGCGGUGGGGGACCACGCGCGAAUACUC-U-GGUGCCCCAGGU
5. Rhodosporidium malvinellum	AGUUGCUACCAUACGAAGAUGAAAGCACUGCAUCCCGUCCGAUCUGCAA-AGUUAAGCAUCUUACGGCCCAGUCAGUACUAUGGUGGGGGACCACGUGGGAAUACUG-U-GGUGUAGCAAUU
6. Atractiella solani	AGGUGCGACCAUACCGUGUUGAAAAUUCUGCAUCCCGUCCGAUCUGCAA-AGACAAGCAACACAGGGCCCAGUCAGUAGUGCGGUGGGGUGACCACGUGCGAAUACUG-U-GGUGUUGCACUU(U)
7. Phleogena faginea	AUGUGCGACCAUACCAAGCUGAAAAUACUGCAUCCCGUCUGAUCUGCAC-AGUCAAGCAGCUUAGGGCCCAGUCAGUAGUGCGGUGGGGGACCAUGCGCGAACAUUG-U-GGUGUUGCACUU
8. Microstroma juglandis	AUCCACGGCCAUAGGACACAGAAAACAUCGCAUCCCGUCCGAUCUGCGC-AAUCAAGCUGUGUACCGCCCAGUCAGUACCGGAGUGGGGGACCAUCCGGGAAUCCUGCCAGGUGCUGUGGUU
9. Farysia thuemenii	AUCUGCAACCAUAGGAUCAUGAAAGCACCGCAUCCCGUCCGAUCUGCGA-AGUUAACCAUGAUACCGGCUUGGAAGUACUGCGGUGGGGGACCACGCGGGAAUGCGA---GCUGUUGCAGUU
10. Tulasnella violea	AUCUUCGGCCAUAGGACAGAGAAAAUACCGCAUCCCGUCCGAUCUGCGC-AGUCAAGCUCUGUACCGCUUAGUUAGUACCAUAGUGGGGGACCAUAUGGGAAUCCUG---AGUGCUGAAGUU(U)
11. Ustilago maydis	AUCUGCGGCCACAGAGACUUGAAAAUACCGCAUCCCGUCCGAUCUGCGC-AGUCAAGCAAGUCGUCGCCUAGCCAGUACUGCGGUGGGGGACCACGCGGGAAUCCUA---GGUGCUGCAGUU
12. Ustilago hordei	AUCUGCGGCCAUAGAACCUUGAAAGCACCGCAUCCCGUCCGAUCUGCGA-AGUUAAGCAAGGUAUCGCCUAGUCAGUACUGCGGUGGGGGACCACGCGGGAAUCCUA---GGCGCUGCAGUU(U)
13. Ginanniella primulicola	AUCUGCGGCCAUAGAACCUUGAAAGCACCGCAUCCCGUCCGAUCUGCGA-AGUUAAGCAAGGUAUCGCCUAGUCAGUACUGCGGUGGGGGACCAUGCGGGAAUCCUA---GGUGCUGCAGUU(U)
14. Graphiola phoenicis	AUCUGCGGCCAUAGAACCGUGAAAAUACCGCAUCCCGUCCGAUCUGCGA-AGUCAAGCACGGUAUCGCCUAGUCAGUACUGCGGUGGGGGACCACGCGGGAAUCCUG---GGUGCUGCAGUU
15. Coleosporium tussilaginis	AUCCACGGCCAUAGGACCUUGAAAACACCGCAUCCCGUCCGAUCUGCGC-AGUUAACCAGGGUGCCGCCUAGUUAGUACCACGGUGGGGGACCACGCGGGAAUCCUA---GGUGCUGUGGUU
16. Endophyllum sempervivi	AUCCACGGCCAUAGGACCCUGAAAGCACCGCAUCCCGUCCGAUCUGCGC-AGUUAACCAGGGUGCCGCCUAGUUAGUACCACGGUGGGGGACCACGCGGGAAUCCUA---GGUGCUGUGGUU(U)
17. Exidia glandulosa	AUCCACGGCCAUAGGACUCUGAAAGCACUGCAUCCCGUCCGAUCUGCAA-AGUUAACCAGAGUACCGCUCAGUUAGUACCAUGGUGGGGGACCAUGCGGGAAUCCUG---GGUGCUGUGGUU
18. Efibulobasidium albescens	AUCCACGGCCAUAGGACUCUGAAAGCACCGCAUCCCGUCCGAUCUGCGC-AGUUAACCAGAGUGCCGCCCAGUUAGUACCACGGUGGGGGACCACGCGGGAAUCCUG---GGUGCUGUGGUU
19. Christiansenia pallida	AUCCACGGCCAUAGGACUCUGAAAGCACCGCAUCCCGUCCGAUCUGCGC-AGUUAACCAGAGUGCCGCCUAGUUAGUACCACGGUGGGGGACCACGCGGGAAUCCUA---GGUGCUGUGGUU
20. Ceratobasidium cornigerum	AUCCACGGCCAUAGGACUUCGAAAGCACCGCAUCCCGUCCGAUCUGCGC-AGUUAACCGGAGUGCCGCCUAGUUAGUACCACGGUGGGGGACCACGCGGGAAUCCUG---GGUGCUGUGGUU(U)
21. Lycoperdon pyriforme	AUCCACGGCCAUAGGACUCUGAAAGCACCGCAUCCCGUCCGAUCUGCGC-AGUUAACCAGAGUGCCGCCUAGUUAGUACCACGGUGGGGGACCACGCGGGAAUCCUG---GGUGCUGUGGUU
22. Taphrina deformans	AUCUGCGGCCAUACCUCCAUGAAAAUACUGCUUCCCGUCCGAUCAGCAA-AGUCAAGCAUGGAAGGGAUUCGUUAGUACUAUCGUGGGAGACCAGAUGGGAAUCCGG---GUUGCUGCAGUU
23. Kabatiella microsticta	ACAUACGGCCACAGUCAGCUGAAAACUGGGCAUCCCGUCCGCUCUGCCAUACAUAAGCAGUUGAACGGCAGAUUAGUACUACGGUGGGUGACCACGUGGGAAUCCCU---GCUGCUGUAUGU(U)

Tabelle 1: Nukleotidsequenzen der bearbeiteten Basidiomyceten. Heterogene 3'-Enden sind durch Einklammerung angezeigt. Der Anteil der längeren Moleküle an der Gesamt-5S-rRNA wurde anhand der Schwärzung der Autoradiographien geschätzt und betrug zwischen 20 und 30%.
Die Nukleotidsequenz von Ustilago longissima ist bis auf das heterogene 3'-Ende identisch mit der von Ginanniella primulicola (13); die Sequenzen von Gymnosporangium clavariaeforme und Puccinia poarum sind identisch mit der von Coleosporium tussilaginis (15); die Sequenz von Uthatobasidium fusisporum stimmt bis auf das heterogene 3'-Ende mit der von Ceratobasidium cornigerum (20) überein. Bei Kabatiella microsticta besitzen etwa 20% der Moleküle ein 'G' in Position 3.

als ein Maß für den Verwandtschaftsgrad von Arten Verwendung finden können (KIMURA, 1968, 1980, 1983; KIMURA und OHTA, 1973, LANGLEY und FITCH, 1974). Dabei liegt die wesentliche Stärke der Verwendung von Makromolekülsequenzen bei Untersuchungen mit phylogenetischer Fragestellung darin, daß die genetische Drift bei Organismen, die nur einen geringen Verwandtschaftsgrad aufweisen, ein konvergentes Entstehen von sehr ähnlichen oder identischen Makromolekülsequenzen nicht zuläßt.

3.1.2 Die Verwendung von ribosomalen RNAs für Untersuchungen mit phylogenetischen Fragestellungen

Ribosomale RNAs haben sich als besonders geeignet für Untersuchungen mit phylogenetischen Fragestellungen erwiesen. So führte die Erstellung von Oligonukleotidkatalogen der 16S rRNA von Prokaryonten unter anderem zur Entdeckung der separaten Stellung der Archaebakterien (FOX und WOESE, 1977). Indem es möglich wurde, RNA direkt zu sequenzieren (DONIS-KELLER, 1977; PEATTIE, 1979), konnte die aufwendige Methode der Erstellung und Auswertung von Oligonukleotidkatalogen durch den Vergleich vollständiger Sequenzen ergänzt bzw. ersetzt werden. Hier bot sich besonders die 5S rRNA an, weil sie wegen ihrer geringen Länge und dem weitgehenden Fehlen von modifizierten Nukleotiden (ERDMANN, 1984) methodisch gut zugänglich ist. Seit Ende der Siebziger Jahre wurde eine große Anzahl von 5S rRNA Sequenzen bestimmt (ERDMANN, l.c.) und für phylogenetische Fragestellungen herangezogen (HORI und OSAWA, 1979; KÜNTZEL et al., 1981, 1983; KUMAZAKI et al., 1983; GEORGE et al., 1983; HORI et al., 1984; ULBRICH et al., 1984). Insbesondere die zusammenfassenden Arbeiten von HORI und OSAWA (1979) und KÜNTZEL et al. (1981, 1983) zeigen, daß die 5S rRNA-Sequenzen von verwandtschaftlich weit entfernten Organismen deutlich verschieden sind. Innerhalb der Prokaryonten ist ein umfassender Vergleich der 5S rRNA-Stammbäume mit anhand von Proteinsequenzen erstellten Stammbäumen möglich. Nach GEORGE et al. (1.c.) weisen diese Stammbäume weitgehende Übereinstimmungen auf.

3.1.3 Mögliche Fehlerquellen bei der Ableitung von phylogenetischen Beziehungen anhand von 5S rRNA Sequenzen und das Auflösungsvermögen der 5S rRNA

Bei der Ableitung von phylogenetischen Beziehungen anhand von 5S rRNA Sequenzen sind einige mögliche Fehlerquellen zu berücksichtigten, die im folgenden diskutiert werden.

Beim Vergleich von verschiedenen Proteinsequenzen von Wirbeltieren konnten LANGLEY und FITCH (1974) Schwankungen in den Aminosäureaustauschraten bis um den Faktor 2 nachweisen. Es besteht daher die Möglichkeit, daß auch bei den Basidiomyceten Schwankungen in den Aminosäure- bzw. Nukleotidsubstitutionsraten auftreten könnten. Bei den Wirbeltieren hatte diese Fehlerquelle jedoch nur äußerst geringe Auswirkungen. So kamen LANGLEY und FITCH (l.c.) zum Schluß, daß trotz der festgestellten Variation bei den Aminosäureaustauschraten sich dennoch gute Übereinstimmungen der anhand der Proteinsequenzen erstellten Stammbäume mit paläontologischen Daten ergeben.

Ein weiterer Faktor der berücksichtigt werden sollte ist die geringe Länge der 5S rRNA. Mit nur etwa 120 Nukleotiden ist das Molekül relativ klein und die mögliche Anzahl neutraler Mutationen daher begrenzt. Hinzu kommt, daß sich durch Mehrfachaustausche zufällige Übereinstimmungen ergeben können, die bei einem kleinen Molekül stärker ins Gewicht fallen als bei einem großen. Daher muß mit einem relativ groben Auflösungsvermögen gerechnet werden. Bezugnehmend auf die erste Arbeit von WALKER und DOOLITTLE (1982) bemerkte TEMPLETON (1983), daß die Ableitung von Verwandtschaftverhältnissen bei den Basidiomyceten unterhalb eines Niveaus von etwa 20 Nukleotidaustauschen in der 5S rRNA aus statistischen Gründen nur von geringer Aussagekraft wären. Da bei den Basidiomyceten jedoch weit höhere Austauschraten bis zu 62 unterschiedlichen Nukleotiden auftreten, kann zumindest mit einer Auflösung der evolutiven Hauptlinien gerechnet werden.

WALKER (1984) führte an, daß die ribosomalen RNA-Gene in einer hohen Kopienzahl vorliegen und daher die Möglichkeit besteht, daß RNA Sequenzen verglichen werden, die eventuell verschiedenen Ursprungs

sind. Diese Möglichkeit kann prinzipiell nicht ausgeschlossen werden. Untersuchungen zur Genomanordnung bei Saccharomyces cerevisiae (McMAHON et al., 1984) zeigten daß neben den etwa 100 tandemartig angeordneten, alternierenden 35S und 5S rDNAs noch ein zweiter Typ von 5S rRNA-Genen existiert. Es ist jedoch unklar, ob dieser zweite Gen-Typ exprimiert wird. Zudem unterscheidet er sich in nur 3 Positionen vom "normalen" exprimierten Gen, so daß sich auch unter Berücksichtigung des zweiten Gen-Typs keine Änderung bei der Einschätzung der phylogenetischen Position von Saccharomyces cerevisiae ergäbe.

Das Vorkommen von verschiedenen 5S rRNAs in einem Organismus kann ebenfalls als mögliche Fehlerquelle bei der Ableitung von phylogenetischen Beziehungen anhand von 5S rRNA Sequenzen angeführt werden. Auch diese Fehlerquelle muß jedoch aufgrund der bisher von Pilzen vorliegenden Daten als gering eingestuft werden. Zum einen wurden bei den Basidiomyceten im Gegensatz zu den Ascomyceten (CHEN et al., 1984) bisher keine unterschiedlichen 5S rRNAs in einem Organismus gefunden, abgesehen von einer gelegentlichen Längendifferenz, die sich durch ein zusätzliches "U" am 3'-Ende ergibt. Zum anderen weisen die bei Ascomyceten auftretenden verschiedenen 5S rRNAs nur geringe Sequenzunterschiede auf, die bei der Beurteilung der phylogenetischen Position einer Art nicht ins Gewicht fallen würden.

3.2 Aspekte der verschiedenen Auswertungsverfahren bei Vergleich von 5S rRNA Sequenzen

3.2.1 Die Bedeutung der 5S rRNA Sekundärstruktur für die Ableitung von phylogenetischen Zusammenhängen bei den Basidiomyceten

Als ein besonders gewichtiges Merkmal von 5S rRNA Sequenzen muß die aus der Primärstruktur abgeleitete Sekundärstruktur, die die intramolekularen Basenpaarungen und Schleifenbildungen berücksichtigt, angesehen werden. Durch Insertionen oder Deletionen von einzelnen Nukleotiden in der allen Eukaryonten gemeinsamen 5S rRNA Grundstruktur mit fünf Helices und fünf Schlaufenbereichen (ERDMANN, 1984) ergeben sich für Großverwandtschaften charakteristische Sekundärstrukturen (DELIAS und ANDERSON, 1982; KÜNTZEL, 1983).

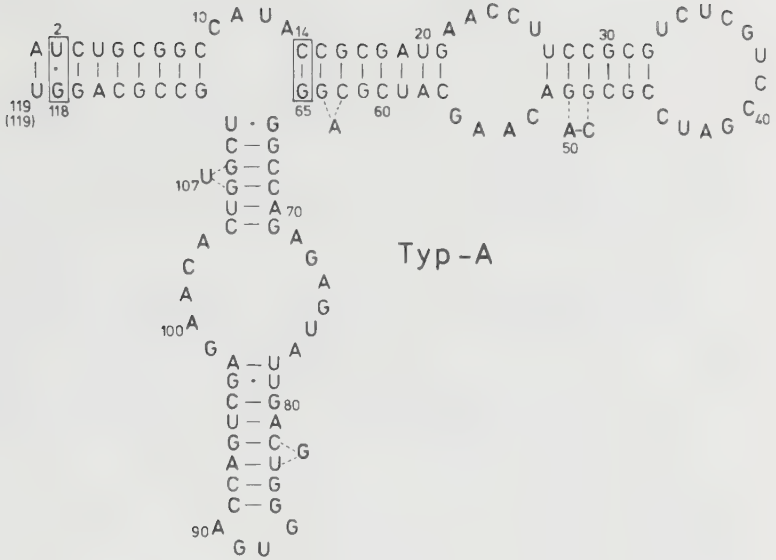
Innerhalb der Basidiomyceten lassen sich zwei Hauptgruppen mit unterschiedlichen Sekundärstrukturen ausmachen (siehe Abb. 5). Dabei besitzt die eine Gruppe ein extrahelikales "U" in Position 107 des Moleküls (Typ A), während dieses Nukleotid bei der anderen Gruppe fehlt (Typ B). Die Typ-A-Moleküle weisen eine Länge von 119 Nukleotiden auf, die Typ-B-Moleküle eine Länge von 118 Nukleotiden. Da die höchsten Sequenzhomologien in den Sequenzclustern bei Organismen mit übereinstimmender Sekundärstruktur zu finden sind (siehe Abb. 6), liegt der Schluß nahe, daß die unterschiedlichen Sekundärstrukturen zwei evolutive Hauptlinien der Basidiomyceten kennzeichnen.

Da im Vergleich der Arten mit Typ-A-Sekundärstrukturen untereinander höhere Divergenzen auftreten als bei den Vertretern der Basidiomyceten mit Typ-B-Sekundärstrukturen, könnten die letzteren aus der Typ-A-Linie, einhergehend mit der Deletion des "U" in Position 107, abgeleitet werden. Für diese Möglichkeit, bei der die Nukleotidaustauschraten als annähernd gleich vorausgesetzt werden, spricht, daß sich in der Gruppe mit Typ-A-Sekundärstrukturen ausschließlich Arten mit einfachen Septenporen befinden, während in der anderen Gruppe sowohl Arten mit einfachen Septenporen, als auch mit Doliporen vorkommen. Damit ergäbe sich eine Ableitung der höher entwickelten Basidiomyceten aus Vertretern mit ursprünglichen Merkmalen. Eine andere Möglichkeit wäre jedoch, daß die Nukleotidaustauschraten in dieser Gruppe höher waren als in der anderen (WALKER und DOOLITTLE, 1983), und daß sich so durch den Vergleich der beiden Linien ein etwas verzerrtes Bild ergibt. Da dies nicht ausgeschlossen werden kann sind in Abb. 7 die beiden Alternativen schematisch einander gegenübergestellt.

Ascomyceten und Basidiomyceten unterscheiden sich aufgrund ihrer 5S rRNA Sekundärstrukturen deutlich. Während Kabatiella microsticta ein zusätzliches "U" in Position 50 aufweist, das bisher nur bei Ascomyceten gefunden wurde, und damit als Ascomycet charakterisiert ist, muß Taphrina deformans aufgrund der 5S rRNA Sekundärstruktur bei den Basidiomyceten eingeordnet werden (siehe Abb. 8). Diese Zuordnungen werden durch die "Signature Nucleotide Analysis" und den Vergleich der 5S rRNA Primärstrukturen mit Asco- und Basidiomyceten bekräftigt.

Abbildung 5: Nukleotidsequenz und Sekundärstruktur der 5S rRNA von Ustilago scabiosae (oben) und Uthatobasidium fusisporum als Beispiele für Basidiomyceten mit Typ-A- bzw. Typ-B-Sekundärstrukturen (siehe 3.2.1).

Die Positionen 2/118 und 14/65, die in der "Signature Nucleotide Analysis" zur weiteren Charakterisierung der Typ-A/Typ-B-Sekundärstrukturen verwendet werden, sind eingerahmt (siehe 3.2.2). Die Zahlen geben die jeweiligen Nukleotidpositionen an; die eingeklammerten Zahlen beziehen sich auf die tatsächliche Nukleotidanzahl des Moleküls.


Typ-A

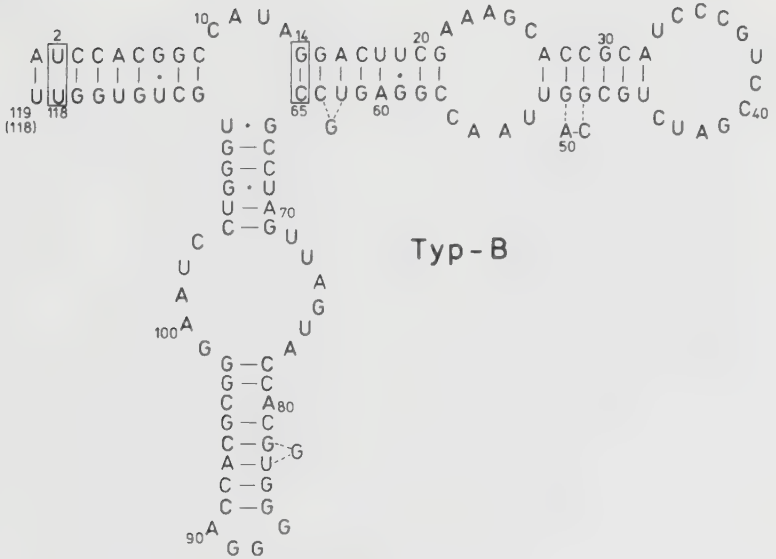
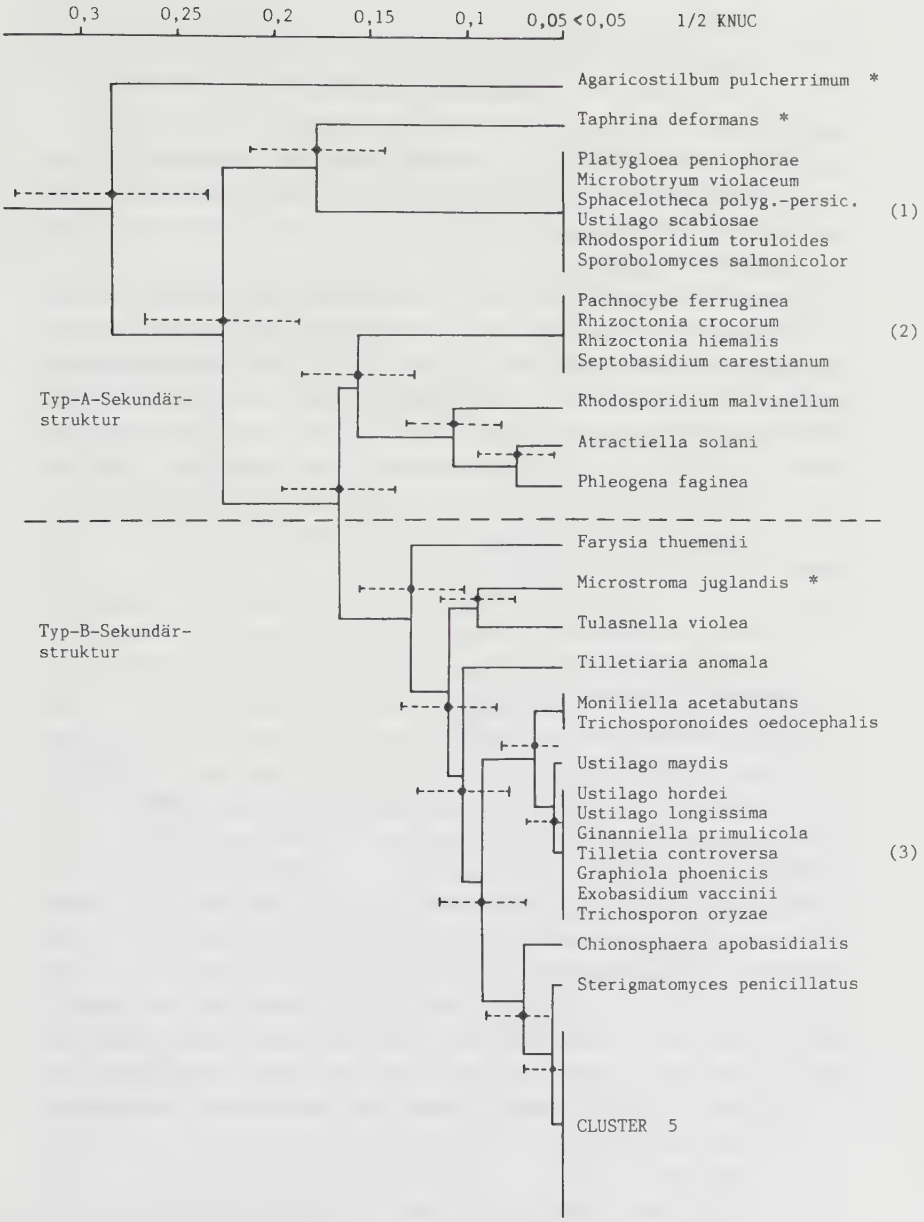

Typ-B

Abbildung 6: Auf dem Vergleich der 5S rRNA Sequenzen von 57 Basidiomyceten basierendes Dendrogramm.

Ein Wert von 0,1 1/2KNUC entspricht etwa 24 unterschiedlichen Nukleotiden der 5S rRNAs (siehe 3.2.3). Der Bereich der "Standard-Fehler" für die einzelnen Verzweigungen ist mit gestrichelten Linien angegeben. Die gestrichelte Linie in der Mitte trennt Arten mit Typ-A- bzw. Typ-B-Sekundärstrukturen. Für die mit einem Stern gekennzeichneten Arten gilt die TypA-/TypB-Zweigliederung nur mit Einschränkungen. Die Zahlen in Klammern geben die Nummerierung der Sequenzcluster nach WALKER und DOOLITTLE (1983) an, die in dieser Arbeit übernommen wurde. Die Arten des Clusters 5 sind unten aufgeführt.

CLUSTER 5:

Coleosporium tussilaginis
Endophyllum sempervivi
Gymnosporangium clavariaeforme
Puccinia poarum
Filobasidium capsuligenum
Filobasidium floriforme
Cryptococcus albidus
Christiansenia pallida
Itersonilia perplexans
Exidia glandulosa
Efibulobasidium albescens
Rhizoctonia globularis
Tremella mesenterica
Bullera alba
Pfaffia rhodozyma
Dacrymyces stillatus
Auricularia auricula-judae
Ceratobasidium cornigerum
Uthatobasidium fusisporum
Agaricus edulis
Bjerkandera adusta
Coprinus radiatus
Lycoperdon pyriforme
Pleurotus ostreatus
Russula cyanoxantha
Schizophyllum commune


0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
<0,05
1/2 KNUC
Agaricostilbum pulcherrimum *
Taphrina deformans *
Platygloea peniophorae
Microbotryum violaceum
Sphacelotheca polyg.-persic.
Ustilago scabiosae
Rhodosporidium toruloides
Sporobolomyces salmonicolor
(1)
Pachnocybe ferruginea
Rhizoctonia crocorum
Rhizoctonia hiemalis
Septobasidium carestianum
(2)
Typ-A-Sekundär-
struktur
Rhodosporidium malvinellum
Atractiella solani
Phleogena faginea
Farysia thuemenii
Microstroma juglandis *
Typ-B-Sekundär-
struktur
Tulasnella violea
Tilletiaria anomala
Moniliella acetabutans
Trichosporonoides oedocephalis
Ustilago maydis
Ustilago hordei
Ustilago longissima
Ginanniella primulicola
Tilletia controversa
Graphiola phoenicis
Exobasidium vaccinii
Trichosporon oryzae
(3)
Chionosphaera apobasidialis
Sterigmatomyces penicillatus
CLUSTER 5

3.2.2 Die "Signature Nucleotide Analysis" als Methode zur Ableitung von natürlichen Verwandtschaften

WALKER (1984) benutzte die sogenannte "Signature Nucleotide Analysis", um natürliche Verwandtschaften der Basidiomyceten anhand der 5S rRNA Sequenzdaten zusammenzufassen. Er verwendetete dabei eine Tabelle, in der aus den vollständigen 5S rRNA Sequenzen einzelne Nukleotide, die sich an jeweils vergleichbaren Positionen befinden, ausgewählt und zur Bewertung der verwandtschaftlichen Verhältnisse herangezogen wurden. Seine Ableitungen veranschaulichte er in einem Dendrogramm ohne Maßeinheitskala, indem er Gruppen von Arten, analog den Sequenzclustern, zusammenfaßte. Diese Methode bietet den Vorteil, daß die 5S rRNA Sekundärstruktur berücksichtigt wird. So wird der linke Hauptzweig von WALKERs Dendrogramm von den Sequenzclustern 1 und 2 mit Typ-A-Sekundärstrukturen gebildet, während die Arten mit Typ-B-Sekundärstrukturen in rechten Hauptzweig zusammengefaßt sind. Die Darstellung entspricht also weitgehend der Abb.7b in dieser Arbeit.

Neben der die Sekundärstruktur verändernden Insertion bzw. Deletion des "U" in Position 107 zeigt die "Signature Nucleotide Analysis" noch zwei weitere Positionen auf, welche die Typ-A- bzw. Typ-B-Moleküle weiter charakterisieren, jedoch keine Deletionen oder Insertionen sind. Diese Zusatzcharakterisierung trifft auf alle bisher untersuchten Basidiomycetensequenzen mit Ausnahme von Agaricostilbum pulcherrimum und mit Einschränkungen auf Taphrina deformans zu. So ist auffällig, daß alle 5S rRNAs mit Typ-B-Sekundärstrukturen in den Positionen 2/118 eine "U-U"-Mißpaarung aufweisen, während bei den 5S rRNAs mit Typ-A-Sekundärstruktur dort stets ein "G-U" oder "U-G" zu finden ist. Ebenso besitzen alle untersuchten Arten mit Typ-B-Sekundärstrukturen in den Positionen 14/65 ein "G-C"-Paar, dem ein "C-G"-Paar bei den Arten mit Typ-A- Sekundärstrukturen gegenübersteht. Da diese Zusatzcharakterisierung auf 55 der bisher untersuchten 57 Basidiomycetensequenzen zutrifft, kann angenommen werden, daß es sich hier um konservative Molekülbereiche handelt.

Die genauere Beschreibung der Typ-A- bzw. Typ-B-Strukturen erlaubt weiterhin die Einordnung von Microstroma juglandis, die eine Insertion

von drei Nukleotiden ("CCA")in Position 107 aufweist und somit von der Typ-A/Typ-B-Grundstruktur abweicht. Aufgrund des "U-U"-Paars in Position 2/118 und des "G-C"-Paars in Position 14/65 erscheint eine Zuordnung zu den Verwandtschaften mit Typ-B-Molekülen sinnvoll. Dies ergibt sich auch aus den Sequenzhomologien, die im Vergleich mit den Arten dieser Gruppe deutlich höher sind als bei den Arten mit Typ-A-Sekundärstrukturen (siehe Abb. 6 und Tab. 2).

Inwieweit andere "signature nucleotides" für eine weitere Charakterisierung der mittels Sequenzhomologien zusammengefaßten Gruppen sinnvoll angewendet werden können ist fraglich, da ihre Auswahl von den zur Verfügung stehenden Daten abhängt. WALKER (1984) spaltete den Cluster 5 unter Verwendung des Basenpaares "A-C" bzw. "A-U" in der Position 80/96 auf. Er beließ jedoch, wegen der dort höheren Sequenzhomologien Cryptococcus albidus trotz eines "A-U"-Paars bei der Gruppe mit den "A-C"-Paaren . Da jedoch weder die eine noch die andere Gruppe als eine engere Verwandtschaft charakterisierbar ist, scheint die vorgenommene Aufgliederung nicht sinnvoll. Aus diesem Grund wurde das Basenpaar 80/96 in der "Signature Nucleotide"-Tabelle (Tab. 2) nicht verwendet.

Da übereinstimmende "signature nucleotides" durch hohe Sequenzhomologien bedingt werden, spiegelt WALKERs Dendrogramm im wesentlichen die aufgrund weitgehend übereinstimmender 5S rRNA Primärstruktur etablierten Cluster wieder. Auch die in dieser Arbeit in der Tab. 2 aufgeführten "signature nucleotides" beschreiben daher neben den unterschiedlichen Sekundärstrukturen und den diese Sekundärstrukturen weiter spezifizierenden Nukleotiden auch die Hauptmerkmale der 5S rRNA Primärstrukturen, in denen sich die einzelnen Cluster voneinander unterscheiden. Damit ergibt sich eine unterschiedliche Wertigkeit der einzelnen "signature nucleotides". Die "Signature Nucleotide Analysis" kann als sinnvolle Ergänzung des Vergleichs der Primärstruktur verwendet werden, da sie eine übersichtliche Darstellung des Datenmaterials erlaubt und Zusammenhänge veranschaulicht, die aus der Primärstruktur nur schwer zu erkennen sind. Eine weitergehende Auflösung der evolutiven Linien als mit der Primär- und der Sekundärstruktur ist jedoch nicht möglich.

Tabelle 2: "Signature Nucleotide Analysis" der 5S rRNA Sequenzcluster der Basidiomyceten, die in Abb. 6 dargestellt sind.

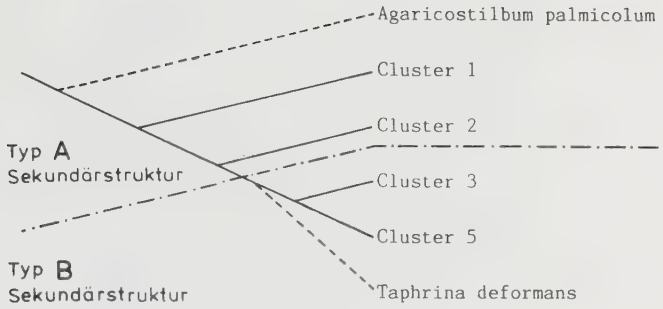
Die Positionen 107, 2/118 und 14/65 werden zur Charakterisierung der Typ-A- bzw. der Typ-B-Sekundärstruktur verwendet. Die Bedeutung der "Signature Nucleotide Analysis" ist unter 3.2.2 bzw. in den Abschnitten, welche die jeweiligen Arten oder Cluster behandeln, diskutiert.

Position:	2/118	3/117	4/116	5/115	14/65	24	32/45	78/98	79/97	88	102	103	107
Agaricostilbum pulcherrimum	AU	UA	AU	AU	GC	A	UA	CG	UG	U	C	C	A
CLUSTER 1	UG	CG	UA	GC	CG	C	GC	UA	UG	U	C	A	U
CLUSTER 2	UG	CG	UA	GC	CG	A	AU	GC	UG	G	U	A	U
Atractiella solani	GU	GC	UA	GC	CG	A	AU	GC	UG	U	U	A	U
Phleogena faginea	UG	GC	UA	GC	CG	A	AU	GC	UG	G	C	A	U
Rhodosporidium malvinellum	GU	UA	UA	GC	CG	A	AU	CG	UG	G	U	A	U
Taphrina deformans	UU	CG	UA	GC	CG	A	UA	CG	UG	A	C	C	-
Farysia thuemenii	UU	CG	UA	GC	GC	A	AU	CG	UG	G	U	G	-
Tilletiaria anomala	UU	CG	UA	GC	GC	A	AU	CG	UG	G	U	C	-
Ustilago maydis	UU	CG	UA	GC	GC	A	AU	CG	UG	G	U	C	-
CLUSTER 3	UU	CG	UA	GC	GC	A	AU	CG	UG	G	U	C	-
Tulasnella violea	UU	CG	UA	UA	GC	A	AU	CG	CG	G	U	C	-
Moniliella acetabutans	UU	CG	CG	GC	GC	A	AU	CG	UG	G	U	C	-
Trichosporonoides oedocephalis	UU	CG	CG	GC	GC	A	AU	CG	UG	G	U	C	-
Microstroma juglandis	UU	CG	CG	AU	GC	A	AU	CG	CG	G	U	C	CCA
Chionosphaera apobasidialis	UU	CG	CG	AU	GC	A	AU	CG	CG	G	U	C	-
Sterigmatomyces penicillatus	UU	CG	CG	AU	GC	A	AU	CG	CG	G	U	C	-
CLUSTER 5	UU	CG	CG	AU	GC	A	AU	CG	CG	G	U	C	-

Abbildung 7: Schematische Dendrogramme der möglichen Phylogenie der Basidiomyceten basierend auf der Primärstruktur, der Sekundärstruktur und den "signature nucleotides" ihrer 5S rRNAs (siehe 3.2).

Abb. 7a berücksichtigt die aus den Primärstrukturen abgeleiteten Sequenzhomolgien stärker als Abb. 7b, bei der die Sekundärstruktur im Vordergrund steht. Die Anordnung von Agaricostilbum palmicolum (= A.pulcherrimum; BRADY und SUTTON, 1984) und Taphrina deformans wurde im wesentlichen unter Berücksichtigung der "signature nucleotides" vorgenommen (siehe 3.3.9 und 3.3.15).

a.


Agaricostilbum palmicolum
Cluster 1
Cluster 2
Typ A
Sekundärstruktur
Cluster 3
Cluster 5
Typ B
Sekundärstruktur
Taphrina deformans

b.

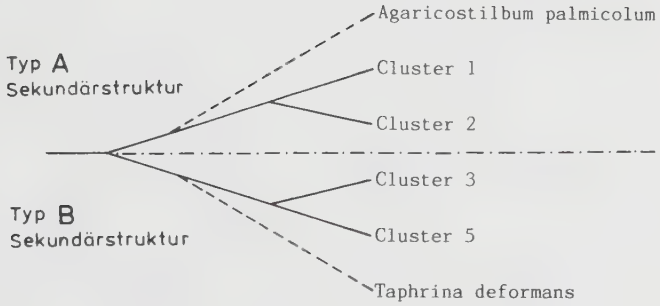
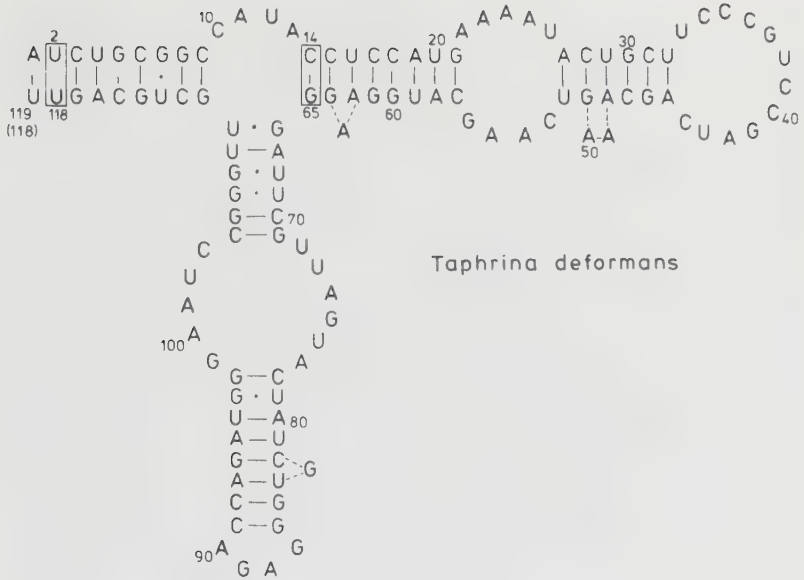
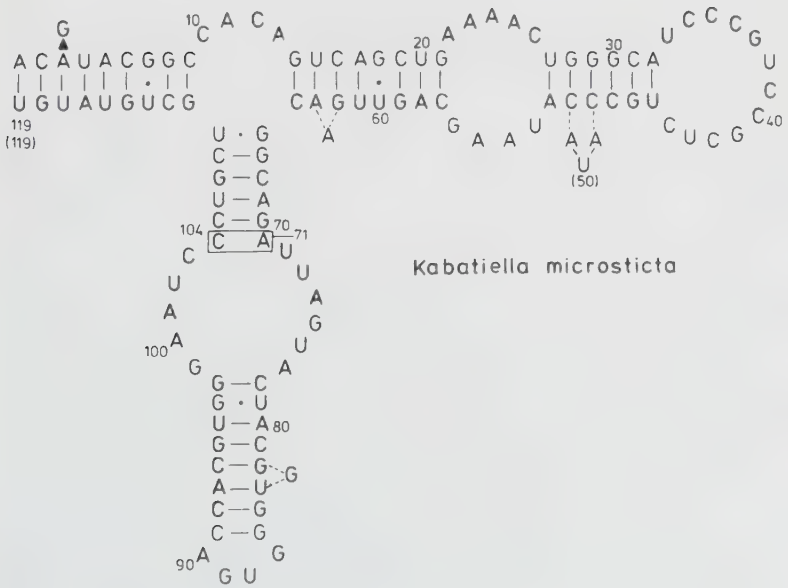

Agaricostilbum palmicolum
Typ A
Sekundärstruktur
Cluster 1
Cluster 2
Cluster 3
Typ B
Sekundärstruktur
Cluster 5
Taphrina deformans

Abbildung 8: Nukleotidsequenzen und Sekundärstrukturen der 5S rRNAs von Taphrina deformans und Kabatiella microsticta als Beispiel für die unterschiedlichen 5S rRNAs von Basidiomyceten und Ascomyceten.

Die Zahlen geben die jeweiligen Nukleotidpositionen an; die eingeklammerten Zahlen beziehen sich auf die tatsächliche Anzahl der Nukleotide des Moleküls. Positionen, die als "signature nucleotides" herangezogen werden, sind eingerahmt. Die 5S rRNA von Taphrina deformans stimmt bis auf das Basenpaar 14/65 mit der Typ-B-Sekundärstruktur der Basidiomyceten überein (siehe Abb. 5 und 3.3.15). Das Vorhandensein eines zusätzlichen "U" in Position (50) wie bei Kabatiella microsticta wurde bisher nur bei Ascomyceten gefunden (siehe 3.3.16). Das Basenpaar 71/104 kann innerhalb der Ascomyceten als "signature nucleotide" verwendet werden (siehe 3.3.16).



Taphrina deformans



Kabatiella microsticta

3.2.3 Die Bewertung der 5S rRNA Primärstruktur

Allen Ableitungen von phylogenetischen Zusammenhängen aus 5S rRNA Sequenzdaten liegt der paarweise Vergleich dieser Sequenzen zugrunde. Auf diese Weise läßt sich zunächst die Anzahl der unterschiedlichen Nukleotide der 5S rRNAs zweier Arten ermitteln. In diesem Wert sind jedoch nicht die unterschiedlichen Einzelwahrscheinlichkeiten von Transversionen und Transitionen berücksichtigt. Er enthält auch kein Maß für die mögliche Ungenauigkeit des Wertes selbst. Deshalb wurde in dieser Arbeit eine von KIMURA (1980) entwickelte Methode verwendet, mit deren Hilfe "evolutionäre Distanzen" (KNUC-Werte) unter Berücksichtigung der Einzelwahrscheinlichkeiten der beiden Austauschtypen berechnet werden und deren mögliche Ungenauigkeit in phylogenetischen Sinn durch einen "Standard-Fehler" angezeigt wird. Dabei entspricht ein Wert von 0,1 1/2KNUC ungefähr 24 Nukleotidaustauschen, der "Standard-Fehler" beträgt in etwa +/- 15%. Diese Methode bietet darüberhinaus den Vorteil, daß die Vergleichbarkeit mit anderen Arbeiten, bei denen 5S rRNA Sequenzunterschiede auf diese Weise bewertet wurden (HORI und OSAWA, 1979; KUMAZAKI et al., 1983; HORI et al., 1984), gegeben ist. Der Nachteil dieses Verfahrens liegt darin, daß nur die Primärstruktur und nicht die Sekundärstrukur der 5S rRNA bewertet werden kann.

Um die Fülle des Datenmaterials überblicken zu können, bietet sich die Konstruktion von Dendrogrammen an. In dieser Arbeit wurde das von KUMAZAKI et al. (1983) verwendete Average-Linkage-Clustering-Verfahren angewendet. Da bei diesem Verfahren die KNUC-Werte der miteinander verbundenen Arten gemittelt werden und so der ursprüngliche, aus den paarweisen Vergleichen der 5S rRNA Sequenzen resultierende Informationsgehalt reduziert wird, können die Dendrogramme das Datenmaterial zwar veranschaulichen, jedoch nicht in allen Fällen befriedigend darstellen. So wird bei Verwendung dieses Verfahrens Taphrina deformans, die eine Typ-B-Sekundärstruktur besitzt, in einer Gabel mit dem Cluster 1 verbunden, das Arten mit Typ-A-Sekundärstrukturen beinhaltet (siehe Abb.6). Die weiten Überlappungen der "Standard-Irrtümer" lassen jedoch auch andere Möglichkeiten, wie einen Anschluß an die Gruppe der Sequenzcluster mit Typ-B-Sekundärstrukturen zu. Daher bedürfen die lediglich auf der 5S rRNA-Primärstruktur basierenden "Stammbäume" der

Ergänzung durch die 5S rRNA-Sekundärstruktur und weiterhin durch alle anderen verfügbaren Merkmale, um einen Stammbaum darzustellen, welcher einer Wiedergabe der tatsächlichen Phylogenie nahekommt.

Das Zusammenfassen von Arten mit hohen Sequenzhomologien zu Sequenzclustern wurde in Anlehnung an WALKER und DOOLITTLE (1983) vorgenommen. Während sich innerhalb ihrer Cluster 1,2,3 und 5 (Cluster 4 enthält nur die Art Tilletiaria anomala) kontinuierlich Sequenzunterschiede bis zu 12 Nukleotide ergaben, unterschieden sich die Cluster untereinander im Durchschnitt in über 20 Nukleotidaustauschen der 5S rRNAs. Daß innerhalb der Sequenzcluster keine signifikante Trennung der Arten mehr möglich ist, zeigen die weitgehenden Überlappungen der "Standard-Fehler" ebenso an, wie offensichtlich zufällige Übereinstimmungen von 5S rRNA Sequenzen nicht eng verwandter Arten (GOTTSCHALK und BLANZ, 1984). So sind z.B. die Sequenzen von Graphiola phoenicis und Exobasidium vaccinii und von Endophyllum sempervivi und Filobasidm floriforme identisch. Dies zeigt an, daß Arten mit identischen Sequenzen nicht näher verwandt sein müssen als andere, sich im selben Sequenzcluster befindende Arten, die im Vergleich mehr Nukleotidaustausche aufweisen. Diesem Umstand wurde Rechnung getragen, indem unterhalb von einem Wert von 0,05 1/2KNUC auf eine weitere Aufgliederung der Dendrogramme verzichtet und die Arten zu einem Sequenzcluster zusammengefaßt wurden. Dabei entspricht dieser Wert etwa den 12 Nukleotiden Unterschied, die von WALKER und DOOLITTLE (1983) als Spannweite der Sequenzcluster verwendet wurden.

Legt man die unter 3.1.1 angeführten Aussagen über die molekulare Evolution zugrunde, so sind die in einem Sequenzcluster zusammengefaßten Arten untereinander näher verwandt als mit den Arten der anderen Cluster. Es ist jedoch schwierig, eine allgemein gültige Clustergrenze festzulegen. Unterhalb der Grenze von 0,05 1/2 KNUC sind in den Clustern 1,2,3 und 5 auffällige Häufungen von Arten mit sehr ähnlichen oder identischen 5S rRNA Sequenzen zu finden. Problematisch ist die Interpretation der phylogenetischen Position von Arten, welche die Clustergrenze geringfügig überschreiten und daher im Dendrogramm als eigener Sequenzcluster erscheinen. Die leicht abgesetzte Stellung von Ustilago maydis (0,06 1/2KNUC) vom Cluster 3 und damit von Ustilago

hordei, der Typusart der Gattung Ustilago, scheint aufgrund einiger morphologischer Unterschiede sinnvoll. Im Fall von Sterigmatomyces penicillatus (0,053 1/2KNUC) und Chionosphaera apobasidialis (0,07 1/2KNUC), die sich leicht vom Cluster 5 unterscheiden, bleibt die Frage offen, ob dieser Sequenzcluster weiter gefaßt werden sollte. Unter Auslassung dieser, am Randbereich angeordneten Organismen lassen sich die Sequenzcluster auf Ebenen von 0,1 bis 0,2 1/2KNUC deutlich voneinander trennen. Die Beziehungen der Sequenzcluster mit übereinstimmender 5S rRNA Sekundärstruktur können nicht eindeutig aufgelöst werden, da die Verzweigungen des Dendrogramms dicht beieinander liegen und die "Standard-Fehler" in diesen Bereich weitgehende Überlappungen zeigen. Eine weitere Differenzierung innerhalb der Cluster erscheint mit dem Merkmal der 5S rRNA nicht möglich. Die separate Stellung der nur durch eine Art repräsentierten Sequenzcluster könnte Ausdruck einer eigenen evolutiven Entwicklung sein. Die Beziehungen dieser Arten zu den Clustern 1,2,3 und 5 sind nicht eindeutig auflösbar. Aufgrund der Sekundärstruktur ist eine Zuordnung zu den Clustern 1 und 2 bzw. 3 und 5 möglich. Weitere verwandtschaftliche Beziehungen müssen unter Berücksichtigung anderer Merkmale diskutiert werden.

3.3 Diskussion der 5S rRNA Sequenzen in Bezug auf einzelne Verwandtschaften innerhalb der Basidiomyceten

3.3.1 Ustilaginales

Aufgrund ihrer 5S rRNA Sequenzen lassen sich die Ustilaginales in zwei Hauptgruppen unterteilen (BLANZ und GOTTSCHALK, 1985). Ustilago hordei, die Typusart der Gattung, zeigt hohe Sequenzhomologien mit Tilletia controversa, Graphiola phoenicis, Exobasidium vaccinii und Trichosporon oryzae und läßt sich damit in den Sequenzcluster 3 (WALKER und DOOLITTLE, 1983; siehe auch Abb. 6) einordnen. Ustilago longissima unterscheidet sich durch den streifenartigen Befall der Blätter des Wirtes, das Keimungsbild und sehr kleine Sporen von U.hordei (SCHMITTER, 1984). Diese Art läßt sich ebenfalls an den Cluster 3 anschließen. Durch den systemischen Befall der Wirtspflanze und eine besondere Schichtung der Sporenwände unterscheidet sich Ustilago maydis von den anderen auf Gräser parasitierenden Ustilaginales-Arten (SCHMITTER, l.c.). Dies

drückt sich auch in der etwas von U.hordei und U.longissima verschiedenen 5S rRNA Sequenz aus. Die Art muß in ein separates Cluster nahe dem Cluster 3 gestellt werden. Die Befunde decken sich weitgehend mit den Ergebnissen der DNA/DNA-Hybridisierung (BLANZ, 1984; BLANZ und GOTTSCHALK, 1984): Die DNAs von Ustilago longissima und U.maydis zeigen jeweils eine geringe Homologie im Vergleich untereinander und mit der DNA von U.hordei. Die auf einigen Carex-Arten parasitierende Farysia thuemenii, die wegen der Bildung von Elateren und umhüllten Sporenlagern in eine eigene Gattung gestellt wird, repräsentiert ebenfalls ein separates Sequenzcluster nahe Ustilago maydis und dem Cluster 3. Bemerkenswert ist, daß Farysia thuemenii in den Positionen 7 und 8 der 5S rRNA Sequenz jeweils ein "A" aufweist, während alle anderen Basidiomyceten dort ein "G" besitzen. Das "G-103" ist ebenfalls ungewöhnlich, da bei den anderen Basidiomyceten in dieser Position stets ein "C" oder "A" zu finden ist (siehe Tab. 2). Welche Bedeutung diesen "signature nucleotides" beizumessen ist, kann derzeit jedoch nicht beurteilt werden.

Alle diese auf Monokotylen parasitierenden Ustilaginales im oder nahe dem Cluster 3 besitzen eine 5S rRNA mit einer Sekundärstruktur vom Typ B. Sie sind damit in diesem Merkmal völlig verschieden von den auf Dikotylen parasitierenden Ustilaginales, die eine 5S rRNA eine Sekundärstruktur vom Typ-A aufweisen.

Aufgrund ihrer 5S rRNA Sequenzen gehören Ustilago scabiosae und Sphacelotheca polygoni-persicariae zusammen mit Microbotryum violaceum dem Cluster 1 an. Wie auch Microbotryum violaceum befallen sie die Antheren ihrer dikotylen Wirtspflanzen (DEML und OBRWINKLER, 1982b; DEML et al., 1985). Aufgrund dieses besonderen Befallsbildes und des auf die Caryophyllaceen beschränkten Wirtsspektrums wurde Ustilago violacea in die Gattung Microbotryum überführt (DEML und OBERWINKLER, l.c.). Ein ebenso beschränktes Wirtsspektrum besitzt die Gattung Sphacelotheca seit LANGDON und FULLERTON (1978) den Genus auf die auf Polygonaceen parasitierenden Vertreter eingrenzten und die auf Monokotylen parasitierenden Arten in die Gattung Sporisorium überführten. Da Ustilago scabiosae in der 5S rRNA ebenso deutlich wie Microbotryum violaceum und Sphacelotheca polygoni-persicariae von U.hordei und den anderen auf Monokotylen

parasitierenden Ustilaginales verschieden ist, sollte auch diese Art nicht länger in die Gattung Ustilago gestellt werden. Vielmehr sprechen die 5S rRNA Daten dafür, diese Arten zusammen mit Rhodosporidium toruloides in eine neue Ordnung zu stellen, zumal sich die Befunde mit weiteren biochemischen Merkmalen korrelieren lassen. So wurde bei den auf Dikotylen parasitierenden Ustilaginales Rhodotorulasäure nachgewiesen, während alle untersuchten, auf Monokotylen parasitierenden Vertreter Sideramine von Ferrichromtyp aufweisen (DEML und OBERWINKLER, 1980, 1982a). Ein weiterer wichtiger Befund ist, daß die DNAs der Vertreter beider Gruppen bei der Hybridisierung untereinander Homologie zeigen, während keine Homologie festzustellen ist, wenn sie gegeneinander hybridisiert werden (BLANZ, 1984, 1985; BLANZ und GOTTSCHALK, 1984). Zymogramme der Leucin-Aminopeptidase (BRADFORD et al., 1975) und der Urease (BAIRD und GARBER, 1979) zeigen ebenfalls die deutliche Unterschiedlichkeit der Ustilaginales mit monokotylen und derjenigen mit dikotylen Wirten.

Die systematische Stellung von Ginanniella primulicola innerhalb der Brandpilze ist ungewiß. Im Gegensatz zu den auf Monokotylen parasitierenden Ustilaginales in diesem Cluster befällt G.primulicola Verteter der dikotylen Primulaceen. Übereinstimmungen ergeben sich jedoch durch das Fehlen von Schleudersporen (NAGLER und OBERWINKLER, 1985), durch den einfachen Septenporus und Sideramine vom Ferrichrom-Typ (DEML, pers. Mitt.). Aufgrund ihrer Holobasidie lassen sich verwandtschaftliche Beziehungen zu den Tilletiales vermuten. Während jedoch Tilletia caries einen Doliporus mit perforiertem Parenthesom besitzt (MOORE 1972; DEML 1977; DEML und OBERWINKLER, 1981), weist G. primulicola wie die Ustilaginales einfache Septenporen auf (NAGLER, pers. Mitt.). G.primulicola läßt sich aufgrund ihrer 5S rRNA Sequenz dem Cluster 3 zuordnen. Da dieser Cluster sowohl Vertreter der Ustilaginales als auch mit Tilletia controversa (WALKER und DOOLITTLE, 1983), deren Conspezifität mit Tilletia caries von KURTZMAN (1983) durch DNA/DNA-Hybridisierung gezeigt wurde, einen Vertreter der Tilletiales enthält, kann die Zugehörigkeit von Ginanniella zu einer der beiden Ordnungen mit Hilfe der 5S rRNA nicht geklärt werden.

3.3.2 Sporobolomyces salmonicolor

Die Basidiomycetenhefe Sporobolomyces salmonicolor befindet sich zusammen mit den auf dikotylen Pflanzen parasitierenden Ustilaginales und Rhodosporidium toruloides im Cluster 1 (WALKER und DOOLITTLE, 1982). Die Autoren verwendeten nach van der WALT (1970) den Namen Aessosporon salmonicolor; nach BANDONI et al. (1975) muß die Art jedoch Sporobolomyces salmonicolor benannt werden. Wie die Brandpilze und Rhodosporidium bildet Sporobolomyces salmonicolor dickwandige Probasidien aus (van der WALT, 1970). Eine weitere Übereinstimmung besteht in den Rhodotorulasäure-Sideraminen (ATKIN et al., 1970). Im Gegensatz zu den anderen Organismen in diesem Cluster bildet Sporobolomyces salmonicolor jedoch Holobasidien aus. Die von OBERWINKLER (1982) aufgezeigte Ähnlichkeit in der Basidienmorphologie mit der Gattung Filobasidium, die im Cluster 5 vertreten ist, muß daher als konvergente Entwicklung gewertet werden.

3.3.3 Trichosporon oryzae

JONG und KING (1977) vertraten die Meinung, daß Trichosporon oryzae (ITO et al., 1974) ein Synonym für Candida edax sei, und daß der Organismus daher den Ascomyceten zuzurechnen ist. Die von WALKER und DOOLITTLE (1983) für diesen Organismus bestimmte 5S rRNA Sequenz ist jedoch eindeutig die eines Heterobasidiomyceten. Für diesen Befund gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Zum einen könnte der von WALKER und DOOLITTLE verwendete ATCC-Stamm mit einer Basidiomycetenhefe kontaminiert gewesen sein. Zum anderen vertreten MEYER et al. (1984) und van der WALT (pers. Mitteilung) die Ansicht, daß es sich bei Trichosporon oryzae nicht um eine Ascomyceten-, sondern um eine Basidiomycetenhefe handelt. Mit ihrer Hypothese eines lateralen Gentransfers zwischen Asco- und Basidiomyceten stellten WALKER und DOOLITTLE (1983) eine weitere Erklärungsmöglichkeit für den unerwarteten Befund zur Diskussion. Ihre Hypothese erscheint jedoch aus mehreren Gründen als äußerst unwahrscheinlich. Zum einen gibt es bisher keinen Nachweis für solch einen horizontalen Transfer von ribosomalen oder anderen Genen zwischen genetisch isolierten Species. Zum anderen wäre anzunehmen, daß ein Austausch oder Transfer der in einer hohen Kopienzahl vorliegenden 5S

rRNA Gene und deren Expression einen erheblichen Eingriff in die Proteinbiosynthesemaschinerie des jeweiligen Organismus darstellen würde. Dabei würden die enormen Sequenzunterschiede und die unterschiedlichen Sekundärstrukturen der 5S rRNAs von Asco- und Basidiomyceten aller Wahrscheinlichkeit nach die komplexen Wechselwirkungen zwischen den ribosomalen RNAs untereinander und zwischen den tRNAs und der 5S rRNA in letaler Weise stören.

3.3.4 Rhodosporidium malvinellum

Die 5S rRNAs von Rhodosporidium malvinellum und R.toruloides bilden übereinstimmend eine Sekundärstruktur vom Typ A aus. Ihre Sequenzen sind jedoch äußerst unterschiedlich und weichen in 34 Positionen voneinander ab. Auch in ihrer Sporenmorphologie zeigen die beiden Species Unterschiede. So sind die Sporen von R.toruloides bauchig rund, während die von R.malvinellum gekrümmt sind (FELL et al., 1973). NAKASE und KOMAGATA (1971) sowie BLANZ (unveröffentlicht) stellten starke Abweichungen im G+C Gehalt der DNA von R.malvinellum im Vergleich mit allen anderen Vertretern der Gattung fest. Während für die übrigen Rhodosporidien G+C-Werte zwischen 56 und 67 mol% festgestellt wurden, lag R.malvinellum mit Werten von 50,5 mol% (NAKASE und KOMAGATA, l.c.) bzw. 46,4 mol% (BLANZ, l.c.) deutlich darunter. Die Rhodosporidien werden als den Ustilaginales nahestehende Saprophyten betrachtet, weil sie ihnen in der Basidienmorphologie und der Ultrastruktur der Septenporen weitgehend entsprechen (MOORE, 1972; OBERWINKLER, 1977, 1978a). Diese nahe Beziehung wird durch die hohe Sequenzhomologie der 5S rRNA von Rhodosporidium toruloides mit denen der auf dikotylen Pflanzen parasitierenden Ustilaginales bekräftigt. Die von diesem Organismus stark abweichende 5S rRNA Sequenz von Rhodosporidium malvinellum stellt, zusammen mit den anderen genannten Merkmalen, die derzeitige Einordnung dieser Species in die Gattung Rhodosporidium in Frage.

3.3.5 Graphiola phoenicis

Graphiola phoenicis ist ein auf den Blättern von Palmen der Gattung Phoenix parasitierender Pilz. Aufgrund ungewöhnlicher morphologischer Merkmale wurde die systematische Stellung von Graphiola phoenicis lange

Zeit kontrovers diskutiert. So wurden die kettenförmig aneinandergereihten Meiosporangien dieses Pilzes von HUGHES (1953) als Konidienträger interpretiert und der Organismus in die Deuteromyceten eingeordnet. Zuvor hatte FISCHER (1883) Beziehungen zu den Brandpilzen vermutet. KILLIAN (1924) kam aufgrund cytologischer Untersuchungen zum Schluß, daß es sich um einen Brandpilz handeln müsse. TUBAKI und YOKOYAMA (1971) untersuchten Kulturen von Graphiola phoenicis und stellten Beziehungen zu den "red yeasts" (Rhodosporidium-Gruppe) zur Diskussion. Dabei stützten sie ihre Argumentation auf die ähnliche Farbe der Hefekulturen von Graphiola phoenicis, Ustilago violacea und Rhodosporidium toruloides sowie auf Gemeinsamkeiten in Bezug auf die Fähigkeit der Organismen, bestimmte Kohlenstoffquellen zu verwerten. DEML und OBERWINKLER (1981) wiesen jedoch bei Graphiola phoenicis Eisentransportverbindungen vom Ferrichromtyp im Gegensatz zum Rhodotorulasäure-Sideramin bei Rhodosporidium toruloides nach. Daher erschien eine nähere Beziehung dieser Organismen fraglich. OBERWINKLER et al. (1982) führten die Ordnung Graphiolales in Übereinstimmung mit DONK (1973) ein. In ihren Untersuchungen stellten sie den Heterobasidiomycetencharakter von Graphiola phoenicis fest, indem sie Meiose in den Sporangien, die Anfärbbarkeit der Hefen mit Diazoniumblau B und Urease-Aktivität nachwiesen. Ebenso gelang es ihnen, die für Heterobasidiomyceten typische Kragenbildung bei der Hefeknospung und einfache Septenporen, wie sie schon von MOORE (1972) gezeigt wurden, nachzuweisen. Sie wiesen darauf hin, daß die Stellung der Graphiolales innerhalb der Heterobasiomyceten weiterhin unklar sei. Aufgrund ihrer 5S rRNA kann Graphiola phoenicis an den Sequenzcluster 3 angeschlossen werden (siehe Abb. 6). Dies bestätigt eindeutig die von OBERWINKLER et al. (l.c.) postulierte Zugehörigkeit zu den Heterobasidiomyceten. Ebenso spricht dieser Befund gegen die von TUBAKI und YOKOYAMA (1971) vermuteten Verwandtschaftsbeziehungen zur Rhodosporidiumgruppe, die durch Rhodosporidium toruloides im Cluster 1 repräsentiert ist. Da die auf monokotylen Pflanzen parasitierenden Ustilaginales mit Ustilago hordei und U.longissima ebenfalls im Cluster 3 vertreten sind, erscheinen Beziehungen zu dieser Gruppe, wie sie von FISCHER (1883) und KILLIAN (1924) angenommen wurden, möglich. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, daß die Basidiosporen von Graphiola wie bei den Ustilaginales durch eine Art Knospungsmechanismus gebildet werden (OBERWINKLER et al., 1982). Weit-

läufigere Beziehungen zu den ebenfalls im Cluster 3 vertretenen Tilletiales und Exobasidiales sind anzunehmen. Die völlige Übereinstimmung mit der 5S rRNA Sequenz von Exobasidium vaccinii muß dagegen als zufällig bewertet werden.

3.3.6 Septobasidium carestianum

Die Septobasidiales sind durch ihre einzigartige Symbiose mit Schildläusen gekennzeichnet. Dabei bilden die Pilze auf der Borke von Nadel- oder Laubbäumen Fruchtkörper, unter deren schützender Schicht sich Schildlauspopulationen entwickeln. Einzelne Individuen dienen dem Pilz zu seiner Ernährung (COUCH, 1938). Das generelle Fehlen von Schnallen, die typische auricularioide Basidie und die denen der Rostpilze sehr ähnlichen einfachen Septenporen (DYKSTRA, 1974; KHAN und KIMBROUGH, 1982) wurden im dem Sinne interpretiert, daß die Uredinales die nächstverwandte Gruppe der Septobasidiales seien (COUCH, 1937; OBERWINKLER, 1977, 1982; KHAN und KIMBROUGH, 1982). Die von Septobasidium carestianum und von den vier Rostpilzen Coleosporium tussilaginis, Gymnosporangium clavariaeforme, Puccina poarum und Endophyllum sempervivi erhaltenen 5S rRNA Sequenzdaten widersprechen jedoch dieser Interpretation. Septobasidium carestianum weist eine 5S rRNA mit einer Typ A Sekundärstruktur auf und muß aufgrund der hohen Sequenzhomologien mit den 5S rRNAs von Pachnocybe ferruginea, Rhizoctonia crocorum und Rhizoctonia hiemalis in den Sequenzcluster 2 gestellt werden. Die 5S rRNAs der untersuchten Rostpilze hingegen haben eine Typ B Sekundärstruktur. Ihre Moleküle zeigen die höchsten Sequenzhomologien mit den 5S rRNAs der im Cluster 5 angeordneten Organismen. Diese hohe Divergenz deutet - unter der Annahme, daß die Uredinales und die Septobasidiales ursprüngliche Gruppen darstellen - auf eine sehr frühe Trennung ihrer evolutiven Linien hin.

3.3.7 Auriculariales

In diesem Abschnitt werden die Beziehungen der drei untersuchten Vertreter der Auriculariales untereinander und die Beziehungen der beiden Arten mit einfachen Septenporen zu den Basidiomyceten im Cluster 1 bzw. 2 behandelt. Die Diskussion der Position von Auricularia auricula-judae

im Cluster 5 erfolgt im Zusammenhang mit den anderen in diesem Cluster vertretenen Organismen (siehe 3.3.8).

OBERWINKLER und BANDONI (1982a) wiesen darauf hin, daß bei den Auriculariales zwei deutlich verschiedene Typen von Septenporen auftreten. Während bei Hirneola (SEBALD 1977) und im Auricularia-Komplex (MOORE, 1978; TU und KIMBROUGH, 1978; McLAUGHLIN, 1980) Doliporen mit durchgehendem Parenthesom gefunden wurden, weisen die anderen Vertreter dieser Ordnung einfache, rostpilzähnliche Septenporen auf (SEBALD, 1977; KHAN und KIMBROUGH, 1982; OBERWINKLER, unveröffentlicht). Die hohe Divergenz der 5S rRNA Sequenzen zweier typischer Vertreter dieser beiden Gruppen, Rhizoctonia crocorum (WALKER und DOOLITTLE, 1983; Cluster 2; Typ-A-Sekundärstruktur) und Auricularia auricula-judae (HUYSMANS et al., 1983; Cluster 5; Typ-B-Sekundärstruktur), bestätigt die Annahme, daß die beiden Gruppen trotz Übereinstimmung in ihrer Basidienmorphologie keine natürliche Verwandtschaft darstellen.

Platygloea peniophorae bildet wie Rhizoctonia crocorum, die anamorphe Form von Helicobasidium purpureum (WARCUP und TALBOT, 1966), eine Typ-A-Sekundärstruktur aus. Die beiden Arten stimmen weiterhin in ihrer typischen auricularioiden Basidie, den einfachen Septenporen und ihrer parasitischen Lebensweise überein. In Bezug auf ihr Wirtsspektrum unterscheiden sie sich jedoch deutlich. Während Helicobasidium purpureum Angiospermen befällt, ist Platygloea peniophorae ein Pilzparasit. Ein weiterer Unterschied besteht in den, in insgesamt 39 Positionen voneinander abweichenden 5S rRNA Sequenzen dieser beiden Vertreter der Auriculariales. Während sich die beiden Arten zunächst auf demselben evolutiven Zweig der Basidiomyceten entwickelt haben könnten, was die übereinstimmende Sekundärstruktur anzeigt, sprechen ihre Positionen im Cluster 1 und 2 für eine frühe Trennung dieser beiden Linien.

Aufgrund der hohen Sequenzhomologien der 5S rRNA von Platygloea peniophorae mit den 5S rRNAs Rhodosporidium toruloides und den auf Dikotylen parasitierenden Ustilaginales kann eine höherer Verwandtschaftsgrad mit den Arten des Clusters 1 als mit Helicobasidium purpureum angenommen werden. Platygloea peniophorae und die anderen Arten dieses Clusters

stimmen darin überein, daß sie querseptierte Basidien und einfache Septenporen ausbilden. Während Platygloea ihre Sporen jedoch aktiv abschleudert, werden die der Ustilaginales durch eine Art Knospungsprozeß passiv freigesetzt (OBERWINKLER, 1977). KHAN und KIMBROUGH (1982) vertraten zudem die Ansicht, daß sich die einfachen Septenporen der Ustilaginales von denen der einfachporigen Auriculariales durch eine leichte Anschwellung der Poruswände und ihren geringen Durchmesser unterscheiden. Trotz dieser morphologischen und ultrastrukturellen Unterschiede scheint eine nähere verwandtschaftliche Beziehung der Arten im Cluster 1 nicht ausgeschlossen zu sein, da auch in den anderen Sequenzclustern, insbesondere in Cluster 5, mehrere unterschiedliche, morphologisch gut definierte Gruppen zusammengefaßt sind.

Rhizoctonia crocorum weist hohe Sequenzhomologien mit den im Cluster 2 angeordneten Arten auf. Demnach wäre eine verwandtschaftliche Beziehung zwischen Rhizoctonia crocorum (= Helicobasidium purpureum) und den durch Septobasidium carestianum repräsentierten Septobasidiales anzunehmen. Bemerkenswert ist, daß in diesem Cluster mit Pachnocybe ferruginea (WALKER, 1984) eine ihre Sporen passiv freisetzende Art anzutreffen ist. Dieser Pilz wurde von OBERWINKLER und BANDONI (1982a) aufgrund seiner Morphologie als Basidiomycet erkannt. Die Autoren bemerkten, daß trotz der Ausbildung von Holobasidien sich dennoch durch die nicht fixierte Zahl der Basidiosporen, den einfachen Septenporus und die Zellwandstruktur Beziehungen zu den auricularioiden Heterobasidiomyceten vermuten ließen. Die Position von P.ferruginea im Cluster 2 zusammen mit Septobasidium carestianum und Rhizoctonia crocorum bekräftigt diese Annahme.

Mit "Rhizoctonia hiemalis" befindet sich eine Art im Cluster 2, deren richtige Bestimmung zweifelhaft ist, und deren Beziehung zu Rhizoctonia crocorum daher nicht beurteilt werden kann. Rhizoctonia hiemalis ist nach WHITNEY und PARMETER (1964) die Nebenfruchtform eines Ascomyceten der Gattung Trichophaea. Die von WALKER und DOOLITTLE (1983) ermittelte 5S rRNA Sequenz des ATCC-Stammes 14016 ist jedoch eindeutig die eines Heterobasidiomyceten. WALKER und DOOLITTLE (1.c.) zogen als mögliche Erklärung für ihren Befund sowohl lateralen Gentransfer zwischen Basidio- und Ascomyceten, als auch eine Stammverwechslung in Betracht.

Ihre Hypothese des lateralen Gentransfers erscheint aus den bereits im Zusammenhang mit Trichosporon oryzae genannten Gründen als unwahrscheinlich (siehe 3.3.3). Zudem konnten WHITNEY und PARMETER (l.c.) bei ihren verschiedenen untersuchten Stämmen bei dem ATCC-Stamm als einzigem keine Ascusbildung beobachten. Eine Stammverwechslung ist daher nicht auszuschließen. Bei ultrastrukturellen Untersuchungen des Stammes am Lehrstuhl für Spezielle Botanik der Universität Tübingen konnten einfache Septenporen festgestellt werden. Eine eindeutige Zuordnung zu den Asco- oder Basidiomyceten war jedoch nicht möglich (OBERWINKLER, pers. Mitt.). Es bleibt zu hoffen, daß eine weitere morphologische und biochemische Charakterisierung des Stammes zu einer Klärung des erwähnten Sachverhaltes führen wird.

3.3.8 Uredinales

Die vier untersuchten Vertreter der Uredinales unterscheiden sich deutlich in ihren Wirtsspektren und in der Verteilung der monokaryotischen bzw. dikaryotischen Phase ihres Generationswechsels in Bezug auf die Wirte (GÄUMANN, 1959). Coleosporium tussilaginis ist ein von Pinus zu Tussilago farfara wirtswechselnder Rostpilz, mit der monokaryotischen Phase auf der Kiefer und der Dikaryophase auf dem Huflattich. Umgekehrte Verhältnisse findet man bei Gymnosporangium clavariaeforme. Bei dieser Art läuft der dikaryotische Entwicklungsabschnitt stets auf dem Gymnospermenwirt ab, während sich die monokaryotische Phase auf dem Angiospermenwirt befindet. Puccinia poarum wiederum wirtswechselt von Gramineen auf Tussilago farfara. Bei diesem Rostpilz befindet sich die monokaryotische Phase auf dem Huflattich. Endophyllum sempervivi schließlich ist ein Rostpilz vom Endo-Typ, bei dem keine Uredo- und Teleutosporen gebildet werden. Aufgrund seiner flaschenförmigen Pyknosporenlager und der Aecidiosporen wird dieser Organismus in die Pucciniaceen gestellt.

Die 5S rRNA Sequenzen der untersuchten Uredinales sind bemerkenswert konstant. Die 5S rRNA von Endophyllum sempervivi weicht in 2 Positionen von denen der anderen Vertreter ab, deren Sequenzen identisch sind (GOTTSCHALK und BLANZ, 1984). Dies zeigt zum einen die Konstanz des Merkmals der 5S rRNA an. Zum anderen kann der Befund dahingehend inter-

pretiert werden, daß die Uredinales durch diese so unterschiedlichen Vertreter gut repräsentiert sind, da die festgestellte Abweichung weit unterhalb der für einen Sequenzcluster festgesetzten Schwankungsbreite von etwa 12 Nukleotidaustauschen liegt. Unter Berücksichtigung des Alters der Wirtspflanzen im paläontologischen Sinne dürften die evolutiven Linien dieser Rostpilze etwa zur Zeit der späteren Entwicklung der Gymnospermen oder der Entstehung der Angiospermen divergiert sein. Das deutet darauf hin, daß mit der 5S rRNA nur solche phylogenetischen Beziehungen aufgelöst werden können, die vor dieser Zeit entstanden sind. Da sich einige Gruppen der Basidiomyceten erst später entwickelt haben dürften, als ihnen mit den Angiospermen Substrate und Symbiosepartner zur Verfügung standen, kann so die heterogene Zusammensetzung der Sequenzcluster erklärt werden. Dies ist insbesondere im Cluster 5 der Fall, in den auch die Uredinales eingeordnet werden. Daß innerhalb eines Clusters keine Trennung von evolutiven Linien mehr möglich ist, zeigt beispielsweise die zufällige Übereinstimmung der Sequenzen von Endopyllum sempervivi und Filobasidium floriforme.

Die Position der Uredinales in einem Cluster mit ansonsten durchweg Doliporen besitzenden Heterobasidiomyceten und Homobasidiomyceten war unter Berücksichtigung der bisherigen Interpretation ihrer morphologischen Merkmale unerwartet. Da einige Vertreter der Uredinales auf Farnen vorkommen, handelt es sich offensichtlich um eine bereits sehr früh evolvierte Gruppe von Organismen. Das an Ascomyceten erinnernde Vorkommen von Pyknidien, die im Vergleich mit den anderen Basidiomyceten relativ lange haploide Phase ihres Entwicklungsganges und der relativ große Anteil von asexuell gebildeten Verbreitungseinheiten werden als weitere ursprüngliche Merkmale angesehen (OBERWINKLER, 1982). OBERWINKLER (1977) vertrat die Ansicht, daß bei den Rosten aufgrund ihrer parasitischen Lebensweise keine Evolution von Fruchtkörpern erfolgte. Ebenso können die einfachen Septenporen und die Phragmobasidie als ursprüngliche Merkmale gelten, in denen sich die Uredinales seit ihrer Entstehung kaum verändert haben.

Mit Auricularia auricula-judae, einem Vertreter der Auriculariales mit Doliporus und Typ-B-Sekundärstruktur, befindet sich neben den Rostpilzen eine weitere Art mit einer typischen auricularioiden Basidie im

Cluster 5. Da sich die morphologische Übereinstimmung auf dieses Merkmal beschränkt, kann nicht entschieden werden, ob es sich hier um eine von den Uredinales abgeleitete saprophytische Verwandtschaft oder eine konvergente Entwicklung handelt. Auffällig ist jedoch, daß mit Ausnahme von Tulasnella violea alle Arten, die wie Auricularia Doliporen mit durchgehendem Parenthesom besitzen, ebenfalls im Cluster 5 befinden. Dies läßt auf eine monophyletische Herkunft dieser Verwandtschaften schließen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß der Ausgangspunkt ihrer Entwicklung ein von den Rostpilzen abgeleiteter Auricularia-ähnlicher Organismus war. Ob die durch ihre 5S rRNA Sequenzen angezeigte Position der Uredinales mit ihrer tatsächlichen Phylogenie übereinstimmt, kann derzeit mit morphologischen Merkmalen nicht schlüssig geklärt werden, da viele Charakteristika der Roste einzig unter Basidiomyceten sind. Zudem dürften viele Eigenschaften der Uredinales im Zusammenhang mit ihrem hochspezialisierten Parasitismus stehen und daher nur bedingt der Ausgangspunkt für Vergleiche mit nicht parasitischen Verwandtschaften sein. Es bleibt daher abzuwarten, ob auch die Vergleiche anderer Makromolekülsequenzen zum selben Ergebnis führen werden.

3.3.9 Atractiellales

OBERWINKLER und BANDONI (1982a) faßten in der Ordnung Atractiellales die gastroiden, auricularioiden Heterobasidiomyceten, sowie einige bis dahin nicht als Basidiomyceten erkannte Arten mit diesen Merkmalen zusammen. Allen Vertretern gemeinsam sind die einfachen Septenporen, die passive Freisetzung der Basidiosporen in einem hefeähnlichen Knospungsprozeß, die Bildung gestielt kopfiger Fruchtkörper, sowie die saprophytische Lebensweise. Mit dieser systematischen Konsequenz trugen OBERWINKLER und BANDONI dem Umstand Rechnung, daß sich diese Arten in der Septenporusstruktur und der Basidienmorphologie deutlich von Auricularia, der Typusgattung der Auriculariales, unterscheiden und somit nicht in dieser Ordnung belassen werden konnten. Die 5S rRNA Sequenzdaten der bisher untersuchten Vertreter der Atractiellales (WALKER, 1984; GOTTSCHALK und BLANZ, in Vorbereitung) bestätigen die von OBERWINKLER und BANDONI (l.c.) festgestellte Zugehörigkeit dieser Arten zu den Basidiomyceten. Sie rechtfertigen eine Abtrennung von den

doliporenbesitzenden Auriculariales, zeigen aber zugleich eine deutliche Heterogenität innerhalb der Ordnung an.

Agaricostilbum pulcherrimum unterscheidet sich in seiner 5S rRNA von allen anderen Basidiomyceten durch ein "A" in Position 107 und ein "G-C"-Paar in Position 14/65 (WALKER, 1984). Mit 40 bis 62 unterschiedlichen Nukleotiden im Vergleich mit den 5S rRNAs der anderen Basidiomyceten kommt diesem Pilz eine isolierte Stellung zu. Das deutet auf eine sehr frühe Divergenz dieser evolutiven Linie hin und wird von den oben genannten "signature nucleotides" unterstrichen. Dabei könnte das Vorhandensein eines Nukleotids in Position 107 auf eine zunächst gemeinsame Evolution mit den Arten, die Typ-A-5S-rRNA-Sekundärstrukturen ausbilden, verweisen. Da sich die Sekundärstrukturen der bisher bekannten 5S rRNAs von Ascomyceten (CHEN et al., 1984) deutlich von der 5S rRNA Sekundärstruktur von Agaricostilbum pulcherrimum unterscheiden und dessen 5S rRNA nur in "signature nucleotides" von den anderen Basidiomyceten 5S rRNAs abweicht, steht eine Einordnung des Art bei den Basidiomyceten, wie sie von WRIGHT et al. (1981) angenommen wurde, außer Zweifel. Zudem konnten OBERWINKLER und BANDONI (1982a) die für Basidiomyceten typische lamelläre Zellwandschichtung und die Kragenbildung bei der Hefeknospung zeigen.

Sehr ähnlich in der Basidienmorphologie und der Fruchtkörperstruktur sind sich Agaricostilbum pulcherrimum und Atractiella solani. Ein Unterschied hingegen bestehen im Fehlen von Hefestadien bei Atractiella (OBERWINKLER und BANDONI, l.c.). Des weiteren wird bei Atractiella pro Teilzelle der Basidie nur eine Spore gebildet, während bei Agaricostilbum bis zu 12 Sporen abgegeben werden. Eine starke Abweichung ergibt sich auch aus dem Vergleich der 5S rRNAs; die 5S rRNA von Atractiella solani hat eine normale Typ-A-Sekundärstruktur und weicht in 51 Nukleotiden von der Sequenz von Agaricostilbum pulcherrimum ab. Eine nahe Verwandtschaft der beiden Arten scheint daher ausgeschlossen zu sein.

Phleogena faginea unterscheidet sich durch dickwandige, pigmentierte Basidiosporen von den anderen Vertretern der Atractiellales (OBERWINKLER und BANDONI, 1982a). Die 5S rRNA Sequenz dieses Pilzes weicht in

nur 16 Nukleotiden von der von Atractiella solani ab. Weitere Übereinstimmungen ergeben sich in der Typ A Sekundärstruktur und in den "Signature Nukleotiden". So weisen Atractiella solani und Phleogena faginea als einzige Basidiomyceten ein "G-C"-Paar in der Position 3/117 auf (siehe Tab. 2). Unter Berücksichtigung der sonstigen gemeinsamen Merkmale der Vertreter der Atractiellales scheint daher die Annahme einer verwandtschaftlichen Beziehung zwischen Atractiella solani und Phleogena faginea berechtigt. Bemerkenswert ist die mit jeweils nur 22 unterschiedlichen Nukleotiden relativ hohe Sequenzhomologie mit der 5S rRNA von Rhodosporidium malvinellum; sie kann derzeit noch nicht erklärt werden.

Die Chionosphaeraceen besitzen als einzige Familie der Atractiellales Arten mit Holobasidien. Da jedoch die 5S rRNA Sequenz von Chionosphaera apobasidialis (WALKER, 1984) mit einer Typ-B-5S-rRNA-Sekundärstruktur und hohen Sequenzhomologien mit den im Cluster 5 zusammengefaßten Arten völlig verschieden von den anderen untersuchten Vertretern der Atractiellales ist, müssen die Ähnlichkeiten in den Fruchtkürperbauplänen als konvergente Entwicklung gedeutet werden.

3.3.10 Microstroma juglandis

Indem er die Kragenbildung bei der Hefeknospung nachwies und den multilamellären Aufbau der Zellwand zeigte, wies BLANZ (1978) die Zugehörigkeit von Microstroma juglandis zu den Basidiomyceten nach. Seine Beobachtungen wurden von von ARX et al. (1982) bestätigt. OBERWINKLER (1978a) stellte die Art in die Ordnung der Cryptobasidiales und vermutete verwandtschaftliche Beziehungen zu den ebenfalls parasitischen, Holobasidien und einfache Septenporen besitzenden Exobasidiales. Die 5S rRNA von Microstroma juglandis weicht mit der Insertion von "CCA" in der Position 107 (GOTTSCHALK und BLANZ, 1984) von allen anderen Basidiomyceten 5S rRNAs ab. Ansonsten besitzt das Molekül mit einem "U-U"-Paar in der Position 2/118 und einem "G-C"-Paar in der Position 14/65 die Merkmale der Typ-B-Sekundärstruktur. Darüberhinaus sind die Sequenzhomologien mit den Arten dieser Gruppe deutlich höher als mit den eine Typ-A-Sekundärstruktur aufweisenden Basidiomyceten. Damit ist Microstroma juglandis zum einen eindeutig als Basidiomycet charak-

terisiert und zum anderen der gleichen Großgruppierung wie Exobasidium vaccinii zuzurechnen. Während sich jedoch Exobasidium vaccinii im Cluster 3 befindet (WALKER und DOOLITTLE, 1983), muß Microstroma juglandis in einen eigenen Sequenzcluster gestellt werden. Die Eigenständigkeit von Microstroma juglandis innerhalb der Basidiomyceten mit Typ-B-5S-rRNA-Sekundärstrukturen wird durch die Insertion von "CCA" in der Position 107 unterstrichen. Dabei wird diesen Nukleotiden keine so hohe Zeigerfunktion wie dem "U" 107 beigemessen, dessen Vorhandensein oder Fehlen zwei Großgruppierungen charakterisiert. Die Tabelle 2 mit den "signature nucleotides" zeigt bis auf die Position 107 eine völlige Übereinstimmung von Microstroma juglandis mit dem Cluster 5. Die morphologischen Merkmale lassen jedoch keine näheren Beziehungen zu Verwandtschaften dieses Clusters erkennen. Daher kann die systematische Stellung von Microstroma juglandis innerhalb der Basidiomyceten mit Typ-B-Molekülen anhand der 5S rRNA nicht weiter spezifiziert werden.

3.3.11 Christiansenia pallida

Aufgrund ihrer 5S rRNA Sequenz wird Christiansenia pallida in den Cluster 5 eingeordnet. Da neben den Vertretern der Filobasidiales in diesem Cluster viele äußerst unterschiedliche Verwandtschaften der Basidiomyceten zusammengefaßt sind, können die Beziehungen der mycoparasitischen Carcinomycetaceen zu den Vertretern dieser Ordnung mit dem Merkmal der 5S rRNA nicht spezifiziert werden. Da die Vertreter der Filobasidiales jedoch auf dieses Cluster beschränkt sind, spricht die Einordnung von Christiansenia pallida nicht gegen die Interpretation von OBERWINKLER und BANDONI (1982b), derzufolge die Übereinstimmungen in der Haustorienmorphologie und im Doliporus ohne Parenthesom eine nähere Verwandtschaft der Carcinomycetaceen mit den Filobasidiales anzeigt.

4.3.12 Exidia glandulosa und Efibulobasidium albescens

Exidia glandulosa und Efibulobasidium albescens wurden als Vertreter der Tremellales mit Doliporen und durchgehendem Parenthesom (WELLS, 1964, 1975; MOORE, 1971) untersucht. Die Einordnung im Cluster 5 läßt eine weitere Differenzierung der verwandtschaftlichen Beziehungen nicht

zu. Es kann daher nicht geklärt werden, wie verschieden diese Art im phylogenetischen Sinn von Tremella mesenterica, die einen Doliporus mit perforiertem Parenthesom aufweist, sind. Da bis auf Tulasnella violea alle bisher untersuchten Arten mit Doliporen und durchgehendem Parenthesom im Cluster 5 zusammengefaßt sind, kann eine monophyletische Entstehung dieser Verwandtschaften angenommen werden. Mit Rhizoctonia globularis, der imperfekten Form von Sebacina spec. (WARCUP und TALBOT, 1966), befindet sich ein weiterer Vertreter der Tremellales im Cluster 5. Das ausschließliche Vorkommen der Vertreter der Tremellales in diesem Cluster dokumentiert damit die Konstanz des Merkmals. Verwandtschaftliche Beziehungen zu den Dacrymycetales, den Ceratobasidiaceen und saprophytischen Vertretern der Auriculariales sind aufgrund des übereinstimmenden Septenporustyps, der Vorkommens auf holzigem Substrat und den hohen Sequenzhomologien ihrer 5S rRNAs wahrscheinlich.

3.3.13 Tulasnellales

Die Tulasnellales werden aufgrund ihrer Sterigmenmorphologie in zwei Familien unterteilt (TALBOT, 1968). Während die Tulasnellaceen angeschwollene, tropfenförmige Sterigmen bilden, sind bei den Ceratobasidiaceen die Sterigmen ebenfalls dick, aber nicht angeschwollen. Aufgrund ihrer 5S rRNA Sequenzen werden Ceratobasidium cornigerum und Uthatobasidium fusisporum in den Cluster 5 gestellt, während Tulasnella violea ein eigenes Sequenzcluster repräsentiert. Die besondere Stellung von Tulasnella violea wird auch durch die "signature nucleotides" unterstrichen. T.violea weist als einziger Basidiomycet ein "U-A"-Paar in der Position 5/115 auf. Die nur geringen Unterschiede in der Basidienmorphologie sowie die Übereinstimmung dieser Arten in ihren Doliporen mit durchgehendem Parenthesom (TU und KIMBROUGH, 1978) und in ihrer Lebensweise als Holzbewohner macht jedoch eine große Kluft zwischen den beiden Familien der Tulasnellales unwahrscheinlich. Alle bisher untersuchten Arten mit Doliporen und durchgehendem Parenthesom sind mit Ausnahme von Tulasnella violea im Cluster 5 zusammengefaßt. Damit ist Tulasnella violea der bisher einzige Fall, bei dem die Untersuchung von mehreren zweifellos nahe verwandten Vertretern der Basidiomyceten zu einer Einordnung in verschiedene Sequenzcluster führt. Dies stellt jedoch nicht die Konstanz des Merkmals an sich in Frage. Es

zeigt jedoch auf, daß insbesondere die Interpretation derjenigen Arten, die eigene Sequenzcluster repräsentieren, schwierig ist. Zudem beschränken sich die Abweichungen auf die Primärstruktur. Die Sekundärstruktur der untersuchten Tulasnellales ist übereinstimmend vom Typ-B.

3.3.14 Lycoperdon pyriforme

Aufgrund seiner 5S rRNA Sequenz wird der Birnenstäubling wie alle anderen bisher untersuchten Homobasidiomyceten im Cluster 5 eingeordnet. Die Übereinstimmung in dem auf die Homobasidiomyceten beschränkten Doliporus mit mehrfach durchbrochenem Parenthesom (TU und KIMBROUGH, 1979; KHAN und KIMBROUGH, 1982) stellt die Zugehörigkeit zu dieser Verwandtschaft außer Frage. Eine weitere Differenzierung der verwandtschaftlichen Verhältnisse in Bezug auf den Anschluß der Lycoperdales an Vertreter der Aphyllophorales oder Agaricales ist mit der 5S rRNA nicht möglich.

3.3.15 Taphrina deformans

Die Taphrinales sind eine seit langem kontrovers diskutierte Ordnung von Pilzen, da sie sowohl Merkmale von Basidiomyceten als auch von Ascomyceten aufweisen. Sie bilden die für Basidiomyceten typischen dikaryotischen Mycelien aus, während ihre Sporenentwicklung wie bei einem Ascus im Innern des Meiosporangiums abläuft (MARTIN, 1940; SYROP, 1975). Diese Merkmale wurden von verschiedenen Autoren unterschiedlich bewertet. DONK (1972, 1973) verglich die Taphrinales mit den Ascomyceten, ebenso wie Von ARX et al. (1982) Taphrina aufgrund ihrer mit Saccharomyces und Hansenia vergleichbaren Zellwandstruktur zu den Endomycetales stellten. SAVILE (1955, 1968, 1976) vertrat hingegen die Ansicht, daß die Taphrinales primitiven Rostpilzen und damit den Basidiomyceten nahestünden. OBERWINKLER (1978b) bemerkte, daß die Taphrinales in vielen wichtigen Eigenschaften den Basidiomyceten gleichen. Er wies darauf hin, daß auch bei einigen typischen Basidiomyceten die Sporen während ihrer Bildung noch von der Wand des Meiosporangiums umgeben sind, und daß daher der Begriff "exogene Sporenbildung" richtig interpretiert werden müsse. Die 5S rRNA von Taphrina deformans zeigt jedoch weitgehende Übereinstimmungen mit den 5S rRNAs

der Basidiomyceten. Dabei weist das Molekül, bis auf das "C-G"-Paar in Position 14/65, mit dem "U-U"-Paar in Position 2/118 und dem Fehlen eines Nukleotids in Position 107 die Merkmale der Typ-B-Sekundärstruktur auf (siehe Tab. 2 und Abb. 8). Da ein "C-G"-Paar in Position 14/65 bei allen Basidiomyceten mit Typ-A 5S rRNA Sekundärstrukturen vorkommt, könnte dieses Basenpaar bei Taphrina deformans eine Art Zwischenstellung zwischen der Typ-A- und der Typ-B-Gruppierung anzeigen. Die größere Übereinstimmung mit der Typ-B-Sekundärstruktur macht jedoch eine zunächst gemeinsame Phylogenie mit den diese Molekülstruktur besitzenden Arten wahrscheinlicher. Aufgrund ihrer 5S rRNA ist Taphrina deformans eindeutig als Basidiomycet charakterisiert.

3.3.16 Kabatiella microsticta

Die Species der Gattung Kabatiella sind Pflanzenparasiten, die ähnlich wie Microstroma juglandis Blattläsionen bewirken und durch die Stomata hervorbrechende sporogene Strukturen erzeugen (Von ARX et al., 1982). BLANZ (1977) vermutete aufgrund positiven Urease-Befundes, Ähnlichkeiten in der Zellwandzusammensetzung und im Sprossungswachstum Beziehungen zu den Exobasidiales. Die 5S rRNA von Kabatiella microsticta zeigt jedoch deutlich die Zugehörigkeit dieser Art zu den Ascomyceten an. So wurde das Vorhandensein eines zusätzlichen "U" in Position 50 (siehe Abb. 8) bisher ausschließlich bei Ascomyceten gefunden (CHEN et al., 1984). Zudem ergibt ein Vergleich der Primärstruktur mit Asco- und Basidiomyceten die höchsten Sequenzhomologien mit Neurospora crassa. Die Zugehörigkeit zu dieser Gruppierung der Ascomyceten wird auch durch die übereinstimmende "A-C"-Mißpaarung in den Positionen 71/104 angezeigt (das Nukleotid "U-50" nicht mitgerechnet).

Abgesehen vom Auftreten heterogener 3'-Enden, wurde das Vorkommen von verschiedenen 5S rRNAs in einem Organismus bei Basidiomyceten bisher nicht beobachtet, während es bei einigen Ascomyceten gezeigt werden konnte (CHEN et al., 1984). Die dabei auftretenden geringen Sequenzunterschiede würden jedoch dabei in keinen Fall zu einer unterschiedlichen Bewertung der phylogenetischen Position der jeweiligen Art mus führen. Das Vorkommen von zwei sich in nur einem Nukleotid unterscheidenden 5S rRNAs bei Kabatiella microsticta ist daher zum einen

nicht ungewöhnlich und ändert zum anderen nichts an der Zuordnung der Art zu den Ascomyceten in die weitläufige Verwandtschaft von Neurospora crassa. Eine genauere Einordnung ist aufgrund der wenigen untersuchten 5S rRNA Sequenzen von Ascomyceten noch nicht möglich.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Der Vergleich der Nukleotidsequenzen der 5S rRNAs der untersuchten Basidiomyceten führt zu einer Unterteilung dieser Pilzklasse in zwei Hauptgruppen mit unterschiedlichen 5S-rRNA-Sekundärstrukturen. Dabei zerfallen die Ustilaginales in zwei Gruppen, die auf monokotylen bzw. auf dikotylen Pflanzen parasitieren. Die Rostpilze sind in Bezug auf ihre 5S rRNA einheitlich. Sie bilden Typ-B-Sekundärstrukturen aus und weisen hohe Sequenzhomologien mit Vertretern der Filobasidiales, der Tremellales, der Dacrymycetales, der Doliporen besitzenden Auriculariales und der Homobasidiomyceten auf. Eine weitere Gruppe mit Typ-B-Sekundärstrukturen, die aufgrund hoher Sequenzhomologien zusammengefaßt werden, sind die Vertreter der auf Monokotylen parasitierenden Ustilaginales, der Graphiolales, der Tilletiales und der Exobasidiales. Die eine Typ-B-Sekundärstruktur besitzenden Arten weisen im Vergleich ihrer 5S rRNAs nur geringe Sequenzhomologien mit den Typ-A-Sekundärstrukturen ausbildenden Vertretern der Septobasidiales, der Atractiellales und der Auriculariales mit einfachen Septenporen und den auf Dikotylen parasitierenden Ustilaginales auf. Innerhalb der Arten mit Typ-A-Sekundärstrukturen erscheinen die auf Dikotylen parasitierenden Ustilaginales als einheitliche Gruppe, während die untersuchten Vertreter der einfache Septenporen besitzenden Auriculariales und der Atractiellales heterogen in Bezug auf ihre 5S rRNA sind.

Die drei zur Bewertung der 5S-rRNA-Sequenzunterschiede herangezogenen Auswertungsverfahren des Vergleichs der "signature nucleotides", der Primär- und der Sekundärstruktur lassen sich für fast alle bearbeiteten Arten zur Deckung bringen. Dies ermöglichte eine zusammenfassende Darstellung der Beziehungen der 57 untersuchten Basidiomyceten anhand ihrer 5S rRNA Sequenzen (Abbildung 6). Die bisher von anderen Organismengruppen bekannten Protein- und Nukleinsäuresequenzdaten sprechen

dafür, daß mit Hilfe der 5S rRNA Sequenzen natürliche Verwandtschaften innerhalb der Basidiomyceten charakterisiert werden. Da sich jedoch nicht in allen Fällen eine Übereinstimmung der 5S-rRNA-Daten mit der bisherigen Interpretation morphologischer und ultrastruktureller Merkmale ergibt, sollten unter alleiniger Berücksichtigung der 5S rRNA Sequenzen derzeit noch keine taxonomischen Konsequenzen gezogen werden. Es bleibt daher abzuwarten, ob auch die Vergleiche der Sequenzen anderer Makromoleküle zu den gleichen Ergebnissen führen werden.

5. LITERATURVERZEICHNIS

Arx von, J.A., Walt van der, J.P., Liebenberg, N.V.D.M: The classification of Taphrina and other fungi with yeast-like cultural states. Mycologia 74(2) 285-296 (1982)

Atkin, C.L., Neilands, J.B., Phaff, H.J.: Rhodotorulic acid from species of Leucosporidium, Rhodosporidium, Rhodotorula, Sporidiobolus and Sporobolomyces, and a new alanine containing ferrichrome from Crytococcus melibiosum. J. Bacteriol. 103, 722-733 (1970)

Baird, M.L., Garber, E.D.: Genetics of Ustilago violacea IV: an electrophoretic survey for urease variants in wild strains. Bot. Gaz. 140, 84-88 (1979)

Bauer, R.: Experimentell-ontogenetische und karyologische Untersuchungen an Uredinales. Dissertation, Universität Tübingen (1983)

Blanz, P.A.: Vergleichende Merkmalsanalysen an Exobasidium-Arten und verwandten Basidiomyceten. Dissertation, Universität Tübingen (1977)

Blanz, P.A.: Über die systematische Stellung der Exobasidiales. Z. Mykol. 44, 91-107 (1978)

Blanz, P.A.: DNA/DNA hybridization studies on various Ustilago species. Abstr. 6th Intern. Symp. on Yeast, Montpellier, IX-8-0 (1984)

Blanz, P.A.: persönliche Mitteilung (1985)

Blanz, P.A., Gottschalk, M.: Natural relationships among smut fungi based 5S ribosomal RNA nucleotide sequences and DNA/DNA hybridizations. Abstr. 12th Int. Conf. on Yeast Genetics and Molecular Biology, Edinburgh,R7, 302 (1984)

Blanz, P.A., Gottschalk, M.: Comparison of 5S ribosomal RNA sequences from smut fungi. Syst. Appl. Microbiol. 5, 518-526 (1984)

Boguski, M.S., Hieter, P.A., Levy, C.C.: Identification of a cytidine-specific ribonuclease from chicken liver. J. Biol. Chem. 255, 2160-2163 (1980)

Bradford, L.S., Jones, R.J., Garber, E.D.: An electrophoretical survey of fourteen species of the fungal genus Ustilago. Bot. Gaz. 136, 109-115 (1975)

Brady, B.L., Sutton, B.C.: Agaricostilbum pulcherrimum (Berk. & Broome) comb. nov.. Trans. Brit. Mycol. Soc. 83, 540-541 (1984)

Brownlee, G.G.: Determination of sequences in RNA. Work, T.S., Work, E. (eds.) North-Holland Publishing Co., Amsterdam (1972)

Buddin, W., Wakefield, E.M.: Studies on Rhizoctonia crocorum (PERS.) DC. and Helicobasidium purpureum (TUL.) PAT. Brit. Mycol. Soc. Trans. 12, 116-140 (1927)

Chen, M.W., Anne, J., Volckaert, G., Huymans, E., Vandenberghe, A., De Wachter, R.: The nucleotide sequences of the 5S rRNAs of seven molds and a yeast and their use in studying ascomycete phylogeny. Nucleic Acids Research 12, 4881-4892 (1984)

Couch, J.N.: A new fungus intermediate between the rusts and Septobasidium. Mycologia 29, 665-673 (1937)

Couch, J.N.: The genus Septobasidium. The University of North Carolina Press (1938)

Delihas, N., Andersen, J.: Generalized structures of the 5S ribosomal RNAs. Nucleic Acids Research 10, 7323-7344 (1982)

Deml, G., Oberwinkler, F.: Studies in Heterobasidiomycetes, part 6: 79. Siderochromes from Heterobasidiomycetes with ontogenetic yeast phases and related species. In: Current developments in yeast research (Stewart, G.G., Russel, I., eds.) Toronto. Pergamon Press, 509-514 (1980)

Deml, G., Oberwinkler, F.: Studies in Heterobasidiomycetes, Part 22. A survey on siderophore formation in low-iron cultured anther smuts of Caryophyllaceae. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C 3, 475-477 (1982a)

Deml, G., Oberwinkler, F.: Studies in Heterobasidiomycetes, Part 24. On Ustilago violacea (Pers.) Rouss. from Saponaria officinalis L. Phytopath. Z. 104, 345-356 (1982b)

Deml, G., Oberwinkler, F., Bauer, R.: Sphacelotheca polygoni-persicariae G.Deml & Oberw. spec. nov.. Phytopathologische Zeitschrift; zur Veröffentlichung eingereicht (1985)

Donis-Keller, H., Maxam, A.M., Gilbert, W.: Mapping adenines, guanines and pyrimidines in RNA. Nucleic Acids Research 4, 2527-2538 (1977)

Donis-Keller, H.: PhyM: an RNase activity specific for U and A residues useful in RNA sequence analysis. Nucleic Acids Research 8, 3133-3142 (1980)

Donk, M.A.: The Heterobasidiomycetes: A reconnaissance I-II, Proc. K. Ned. Akad. Wet. (C) 75, 365-390 (1972); III-V, 76, 1-140 (1973)

Duran, R.: Ustilaginales. In: Ainsworth, G.C., Sparrow, F.K., Sussman, A.S. (Eds.): The fungi, Vol. IVB, A taxonomic review with keys: Basidiomycetes and lower fungi. Academic Press, New York, pp. 281-300 (1973)

Dykstra, M.J.: Some ultrastructural features in the genus Septobasidium. Can. J. Bot. 52, 971-972 (1974)

Erdmann, V.A., Wolters, J., Huysmans, E., Vandenberghe, A., DeWachter, H.: Collection of published 5S and 5.8S ribosomal RNA sequences. Nucleic Acids Research 12, r133-r166 (1984)

Fell, J.W.: Heterobasidiomycetous Yeasts Leucosporidium and Rhodosporidium. Their Systematics and Sexual Incompatibility Systems. Trans. mycol. Soc. Japan 15, 316-323 (1974)

Fell, J.W., Hunter, J.L., Tallmann, A.S.: Marine basidiomycetous yeasts (Rhodosporidium ssp.n.) with tetrapolar and multiple allelic bipolar mating systems. Can. J. Microbiol. 19, 643-657 (1973)

Fischer von E.: Beitrag zur Kenntnis der Gattung Graphiola. Botanische Zeitung 41, 746-756, 762-773, 778-788, 794-801 (1883)

Gäumann, E.: Die Rostpilze Mitteleuropas. Büchler & Co., Bern (1959)

George, D.G., Hunt, L.T., Dayhoff, M.O.: Sequence evidence for the symbiontic origins of chloroplasts and mitochondria. In Schenk, H.E.A., Schwemmler, W., Endocytobiology II, de Gruyter & Co., Berlin-New York, 845-861 (1983)

Gottschalk, M., Blanz, P.A.: Highly conserved 5S ribosomal RNA sequences in four rust fungi and atypical 5S rRNA secondary structure in Microstroma juglandis. Nucleic Acids Research 12, 3951-3958 (1984)

Hori, H., Osawa, S.: Evolutionary change in 5S RNA secondary structure and a phylogenetic tree of 54 5S RNA species. Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 381-385 (1979)

Hori, H., Osawa, S., Takaiwa, F., Sugiura, M.: The nucleotide sequences of 5S rRNAs from a fern Dryopteris acuminata and a horsetail Equisetum arvense. Nucleic Acids Research 12, 1573-1576 (1984)

Hughes, S.J.: Conidiophores, conidia and classification. Can. J. Bot. 31, 577-659 (1953)

Huysmans, E., Dams, E., Vandenberghe, A., De Wachter, R.: The nucleotide sequences of the 5S rRNAs of four mushrooms and their use in studying the phylogenetic position of Basidiomycetes among the eukaryotes. Nucleic Acids Res. 11, 2871-2880 (1983)

Ito, H., Iizuka, H., Sato, T.: A new radioresistent yeast of Trichosporon oryzae nov. sp. isolated from rice. Agr. Biol. Chem. 38, 1597-1602 (1974)

Jong, S.C., King, D.S.: Identity of Sterigmatomyces aphidis and Trichosporon oryzae. Mycotaxon 6, 11-16 (1977)

Khan, S.R., Kimbrough, J.W.: A reevaluation of the Basidiomycetes based upon septal and basidial structures. Mycotaxon 15, 103-120 (1982)

Killian, M.C.: Le development du Graphiola phoenicis Poit. et ses affinites. Rev. Gen. Bot. 36, 385-394, 451-460 (1924)

Kimura, M.: Evolutionary rate at the molecular level. Nature 217, 624-626 (1968)

Kimura, M.: The rate of molecular evolution considered from the standpoint of population genetics. Proc. Natl. Am. Sci. 63, 1181-1188 (1969)

Kimura, M.: A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16, 111-120 (1980)

Kimura, M.: The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press, Cambridge (1983)

Kimura, M., Ohta, T.: Eukaryotes-Prokaryotes divergence estimated by 5S ribosomal RNA sequences. Nature 243, 199-200 (1973)

King, D.S., Jong, S.C.: A contribution to the genus Trichosporon. Mycotaxon 6, 391-417 (1977)

Krupp, G., Gross, H.J.: in The modified nucleosides in transfer RNA II: A laboratory manual of genetic analysis, identification, and sequence determination, Agris, P.F. and Kopper, R.A., Eds., Alan R. Liss, Inc., New York, 33-79 (1983)

Küntzel, H., Heidrich, M., Piechulla, B.: Phylogenetic tree derived from bacterial, cytosol and organelle 5S rRNA sequences. Nucleic Acids Research 9, 1451-1461 (1981)

Küntzel, H., Piechulla, B., Hahn, U.: Consensus structure and evolution of 5S rRNA. Nucleic Acids Research 11, 893-900 (1983)

Kurtzman, C.: Definition of fungus taxa through comparisons of DNA base sequence complementarity. Abstr. 3rd Int. Mycol. Congr., Tokyo, 153 (1983)

Langdon , R.F.N., Fullerton, R.A.: The genus Sphacelotheca (Ustilaginales): criteria for its delimination and the consequences thereof. Mycotaxon 6, 421-456 (1978)

Levy, C.C. and Karpetsky, T.P.: The purification and properties of chicken liver RNase. J. Biol. Chem. 255, 2153-2159 (1980)

Martin, E.: The morphology and cytology of Taphrina deformans. Am. J. Bot. 27, 743-751 (1940)

McMahon, M.E., Stamenkovich, D., Petes, T.D.: Tandemly arranged variant 5S ribosomal RNA genes in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Nucleic Acids Resarch, 12, 8001-8016 (1984)

McLaughlin, D.J.: Ultrastructure of the metabasidium of Auricularia fusco-succinea. Am. J. Bot. 67, 1225-1235 (1980)

Meyer, S.A., Ahearn, D.G., Yarrow, D.: The genus Candida. In: The Yeasts, a taxonomic study. Kreger-van Rij, N.J.W., Ed. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 3rd edition, pp. 585-844 (1984)

Moore, R.T.: Ustomycota, a new division of higher fungi. Antonie van Leeuwenhoek 38, 567-584 (1972)

Moore, R.T.: Taxonomic significance of septal ultrastructure with particular reference to the jelly fungi. Mycologia 70, 1007-1024 (1978)

Moore, R.T.: Taxonomic proposals for the classification of marine yeasts and other yeast-like fungi including the smuts. Botanica Marina 23, 361-373 (1980)

Nagler, A., Oberwinkler, F.: Über die Nebenfruchtformen des Primelbrandes, Ginanniella primulicola (Magnus Ciferri). Z. Mykol. 50, 253-265 (1984)

Nakase, T., Komagata, K.: DNA base composition of some species of yeasts and yeast-like fungi. J. Gen. Appl. Microbiol. 17, 363-369 (1971)

Oberwinkler, F.: Das neue System der Basidiomyceten. In: Beiträge zur Biologie der Niederen Pflanzen. Frey, W., Hurka, H. and Oberwinkler, F., Eds., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp. 59-105 (1977)

Oberwinkler, F.: Was ist ein Basidiomycet? Z. Mykol. 44, 13-29 (1978a)

Oberwinkler, F.: Taxonomy of Basidiomycetes with ontogenetic yeast phases. Abstr. 12th Int. Congress Microbiol. 94: C 38 (1978b)

Oberwinkler, F.: The significance of the morphology of the basidium. In: Basidium and Basidiocarp. Wells, K., Wells, E.K. (Herausg.), Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, 9-36 (1982)

Oberwinkler, F., Bandoni, R.J.: A taxonomic survey of the gasteroid, auriculariod Heterobasidiomycetes. Can. J. Bot. 60, 1726-1750 (1982a)

Oberwinkler, F., Bandoni, R.J.: Carcinomycetaceae: a new family in the Heterobasidiomycetes. Nord. J. Bot. 2, 501-516 (1982b)

Oberwinkler, F., Bandoni, R.J., Blanz, P., Deml, G., Kisimova-Horovitz, L.: Graphiolales: Basidiomycetes parasitic on palms. Pl. Syst. Evol. 140, 251-277 (1982)

Peattie, D.A.: Direct chemical method for sequencing RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 1760-1764 (1979)

Savile, D.B.O.: A phylogeny of the basidiomycetes. Can. J. Bot. 33, 60-103 (1955)

Savile, D.B.O.: Possible interrelations between fungal groups. In: the fungi Vol. 3, Aiinsworth G.C., Sussman A.S. (Herausg.), Academic press, New York, 649-675 (1968)

Savile, D.B.O.: Evolution in the rust fungi (Uredinales) as reflected by their ecological problems. Evol. Biol. 9, 137-207 (1976)

Sebald, F.R.: Feinstrukturstudien zur Ontogenie von Arten der Uredinales und verwandter Basidiomyceten. Dissertation, Universität Tübingen (1977)

Schmitter, A.: Vergleichende Untersuchungen zur Aufklärung von Verwandtschaftsverhältnissen innerhalb der Gattung Ustilago (Pers.) Roussel. Dissertation, Universität Tübingen (1984)

Sundström, K.R.: Studies of the physiology, morphology and serology of Exobasidium. Symb. Bot. Ups. XVIII/3, 1-89 (1964)

Syrop, M.: Leaf curl disease of almond caused by Taphrina deformans. I. A light microscope study of the host/parasite relationship. Protoplasma 85, 39-56 (1975)

Talbot, P.H.B.: Fossilized pre-Patouillardian taxonomy. Taxon 17, 620-628 (1968)

Templeton, A.: Systematic of basidiomycetes based on 5S rRNA sequences and other data. Nature 303, 731-732 (1983)

Tu, C.C., Kimbrough, J.W.: Systematics and phylogeny of fungi in the Rhizoctonia complex. Bot. Gaz. 139, 454-466 (1978)

Tubaki, K., Yokoyama, T.: Cultural aspects of Graphiola phoenicis. Mycopath. Mycol. Appl. 43, 49-60 (1971)

Ulbrich, N., Digweed, M., Erdmann,.V.A.: The nucleotide sequence of the cytoplasmatic 5S rRNA from the horsetail, Equisetum arvense. Nucleic Acids Research 12, 1577-1580 (1984)

Wachter De, R., Chen, M.W., Vandenberghe, A.: Equilibria in 5S ribosomal RNA secondary structure. Eur. J. Biochem. 143, 175-182 (1984)

Walker, W.F.: 5S rRNA sequences from Atractiellales, and basidiomycetous yeasts and fungi imperfecti. Syst. Appl. Microbiol. 5, 352-359 (1984)

Walker, W.F., Doolittle, W.F.: Nucleotide sequences of 5S ribosomal RNA from four oomycete and chytrid water molds. Nucleic Acids Research 10, 5717-5721 (1982)

Walker, W.F., Doolittle, W.F.: Redividing the Basidiomycetes on the basis of 5S rRNA sequences. Nature 299, 723-724 (1982)

Walker, W.F., Doolittle, W.F.: 5S rRNA sequences from eight Basidiomycetes and fungi imperfecti. Nucleic Acids Res. 11, 7625-7630 (1983)

Walt, J. P. van der, Nel, E.E.: Candida edax sp.n. Antonie van Leeuwenhoek 34, 106-108 (1968)

Walt van der, J.P.: The perfect and imperfect states of Sporobolomyces salmonicolor. Antonie van Leeuwenhoek 36, 49-50 (1970)

Warcup, J.H., Talbot, P.H.B.: Perfect states of some rhizoctonias. Trans. Br. Mycol. Soc. 49, 427-435 (1966)

Wells, K.: The basidia of Exidia nucleata. I. Ultrastructure. Mycologia 56, 327-341 (1964)

Wells, K.: Studies of some Tremellaceae. V. A new genus, Efibulobasidium. Mycologia 67, 147-156 (1975)

Whitney, H.S., Parmeter, J.R.jr.: The perfect stage of Rhizoctonia hiemalis. Mycologia 56, 114-118 (1964)

Wright, J.E., Bandoni, R., Oberwinkler, F.: Agaricostilbum: an auricularioid Basidiomycete. Mycologia 73, 880-886 (1981)

Meine akademischen Lehrer waren:

R. Agerer, C.F. Bardele, W. Bessler, P. Blanz, V. Braun, A. Brennicke, A. Hager, K.G. Hantke, G. Jung, D. Mecke, H. Netzel, F. Oberwinkler, K. Poralla, H. Probst, W. Rähle, Evamarie Sander, B. Schwemmle, W. Seyffert, Angelika Wörz, H. Zähner

LEBENSLAUF

Michael Gottschalk

geboren am 19.5.1958 in Göttingen
Eltern: Herbert Gottschalk und Ursula Gottschalk, geb. Jacoby

1964 - 1967	Volksschulen in Blankenhagen (Westfalen) und Oberkochen (Baden-Württemberg)
1967	Progymnasium Oberkochen
1969	Wagenburggymnasium Stuttgart
19.5.1976	Abitur
1.1.1977 - 31.3.1978	Bundeswehr
SS 1978	Immatrikulation an der Universität Tübingen im Studiengang Biologie/Diplom
Frühjahr 1980	Vordiplomprüfungen in den Fächern Botanik, Chemie, Physik und Zoologie.
Frühjahr 1982	Mündliche Diplomprüfungen in den Fächern Mikrobiologie (Hauptfach), Biochemie, Botanik und Genetik.
Juni 1982 - März 1983	Diplomarbeit an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen, über die Reinigung und Charakterisierung von bovinem Interferon-ß.
3.3.1983	Diplom in Biologie
April 1983 - März 1985	Doktorarbeit am Lehrstuhl für Spezielle Botanik der Universität Tübingen bei Prof. Dr. Oberwinkler in der Arbeitsgruppe von Dr. Paul Blanz mit dem Thema "Untersuchungen zur Phylogenie der Basidiomyceten anhand des Vergleichs der Nukleotidsequenzen ihrer 5S ribosomalen Ribonukleinsäuren"
3.6.1983	Heirat mit Gabriele Göttel
Nov. 1983	Aufnahme in die Promotionsförderung der Studienstiftung des deutschen Volkes
1984	Mitarbeit in der Arbeitsgruppe von Dr. Axel Brennicke am Lehrstuhl für Spezielle Botanik der Universität Tübingen über das Initiator-tRNA-Gen in Oenothera-Mitochondrien.

Druck: Zeeb-Druck, Tübingen 7 (Hagelloch)